

**ZUR WIRKUNG VON KALIUMTELLURIT UND
ACTI-DIONE AUF IMPERFEKTE HEFEN**

Rainer A. Kolz

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Dermatologischen Universitätsklinik in München
Direktor : Prof. Dr. med. O. Braun-Falco

ZUR WIRKUNG VON KALIUMTELLURIT UND
ACTI-DIONE AUF IMPERFEKTE HEFEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von



RAINER A. KOLZ

aus

München

München 1975

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter :	Prof. Dr. W. Meinhof
Mitberichterstatter :	Prof. Dr. O. Braun-Falco
Dekan :	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung : 27. 1. 1976	



I n h a l t

=====

Seite

1. <u>EINLEITUNG UND HISTORISCHE ÜBERSICHT</u>	1
1.1. <u>MEDIZINISCHE BEDEUTUNG DER HEFEPILZE</u>	1
1.2. <u>KALIUMTELLURIT IN DER LITERATUR</u>	2
1.2.1. Toxizität von Kaliumtellurit	2
1.2.2. Kaliumtellurit in der Bakteriologie	5
1.2.3. Kaliumtellurit in der Mykologie	7
1.2.3.1. Wirkung auf Schimmelpilze und Dermatophyten	7
1.2.3.2. Wirkung auf Hefepilze	9
1.3. <u>ACTI-DIONE IN DER LITERATUR</u>	13
1.3.1. Toxizität von Acti-dione	13
1.3.2. Acti-dione als Antibiotikum	15
1.3.3. Acti-dione als Antimykotikum	16
1.3.3.1. Wirkung gegen Schimmelpilze und Dermatophyten	17
1.3.3.2. Wirkung auf Hefepilze	24
2. <u>MATERIAL UND METHODIK</u>	31
2.1. <u>FRAGESTELLUNG DER ARBEIT</u>	31
2.2. <u>VERWENDETE SUBSTANZEN</u>	32
2.2.1. Kaliumtellurit	33
2.2.2. Acti-dione (Cycloheximid)	35
2.3. <u>GETESTETE PATHOGENE, FAKULTATIV PATHOGENE UND IMPERFEKTE HEFEN</u>	39
2.4. <u>METHODIK</u>	41
2.4.1. Untersuchungsmaterial - Gewinnung der Teststämme in Reinkultur und ihre morphologische Gattungsdifferenzierung	41
2.4.2. Verwendete Lösungen und Nährböden	50
2.4.3. Durchführung	55

2.4.3.1. Reihenverdünnungstest in der Schräg- agarkultur	55
2.4.3.1.1. Testverfahren beim Reihenverdünnungstest	56
2.4.3.1.2. Makroskopische Untersuchung	60
2.4.3.2. Nachfolgende Untersuchung auf Reisagar ohne Zusatz	61
2.4.3.2.1. Testverfahren bei der Reisagarunter- suchung	62
2.4.3.2.2. Mikroskopische Untersuchung	63
2.4.4. Stärketest bei Cryptococcus	65
2.4.5. Rückimpfungsversuche	67
2.4.6. Physiologische Differenzierung der getesteten Hefepilze	67
 <u>3. U N T E R S U C H U N G S E R G E B N I S S E</u>	 75
3.1. <u>ERGEBNISSE DER IDENTIFIZIERUNG</u>	75
3.2. <u>EMPFINDLICHKEITSTESTUNG VON KALIUMTELLURIT</u>	77
3.2.1. Makroskopische Untersuchungsergebnisse	77
3.2.1.1. Candida species	77
3.2.1.2. Torulopsis species	83
3.2.1.3. Trichosporon species	86
3.2.1.4. Cryptococcus species	89
3.2.1.5. Rhodotorula species	90
3.2.1.6. Ergebnisse der Rückimpfungsversuche	93
3.2.2. Mikroskopische Untersuchungsergebnisse	94
3.2.2.1. Candida albicans	94
3.2.2.2. Übrige Candida-Arten	100
3.2.2.3. Trichosporon species	101
 3.3. <u>EMPFINDLICHKEITSTESTUNG VON ACTI-DIONE</u> <u>(CYCLOHEXIMID)</u>	 105
3.3.1. Makroskopische Untersuchungsergebnisse	105
3.3.1.1. Candida species	105
3.3.1.2. Torulopsis species	110

	<u>Seite</u>
3.3.1.3. Trichosporon species	113
3.3.1.4. Cryptococcus species	119
3.3.1.5. Rhodotorula species	121
3.3.1.6. Ergebnisse der Rückimpfungsversuche	124
3.3.2. Mikroskopische Untersuchungsergebnisse	125
3.3.2.1. Candida albicans	126
3.3.2.2. Übrige Candida-Arten	131
3.3.2.3. Trichosporon species	134
 4. <u>B E S P R E C H U N G U N D B E U R T E I -</u> <u> L U N G D E R U N T E R S U C H U N G S -</u> <u> E R G E B N I S S E</u>	 137
5. <u>Z U S A M M E N F A S S U N G</u>	156
6. <u>L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S</u>	164

1. EINLEITUNG UND HISTORISCHE ÜBERSICHT

1.1. MEDIZINISCHE BEDEUTUNG DER HEFEPILZE

Obwohl die Mykologie der älteste Zweig der Mikrobiologie ist, hat die Bekämpfung und Erkennung der Pilzkrankheiten und damit auch speziell der Hefemykosen erst seit Beginn der antibiotischen Ära eine entscheidende Entwicklung erlebt. Gerade die hefeähnlichen Pilze, in der medizinischen Mykologie zur Klasse der Fungi imperfecti und zum System der hefeartigen Pilze (Hefen) gehörend, haben durch ihre immer häufiger auftretenden pathogenen Eigenschaften in der Medizin und durch ihr Vorkommen in Wissenschaft und Praxis eine über ein einzelnes Fachgebiet herausragende Bedeutung gewonnen. Umfangreiche Untersuchungen über Vorkommen und Bedeutung von Pilzkrankheiten haben ergeben, daß die pilzverseuchten Gebiete auf der Erde um ein Vielfaches zahlreicher sind, als man noch vor wenigen Jahren glaubte. Daher ist es dem einzelnen Mediziner und Wissenschaftler, der sich mit diesen Pilzen beschäftigt, schon lange nicht mehr möglich, die neuere Entwicklung auf diesem Gebiete zu verfolgen oder selbst zu erarbeiten. Außerdem zeigt sich ganz deutlich, daß durch die antibiotischen Erfolge der Medizin andererseits Pilzinfektionen, vor allem durch pathogene Hefen und hefeähnliche Pilze, bei Anwendung bestimmter Antibiotica häufiger auftreten als sonst.

So haben in den letzten Jahren die Erkrankungen durch die hefeähnlichen Pilze (imperfekte Hefen) erheblich an Bedeutung gewonnen. Diese Pilze befallen nicht nur die Haut, sondern auch die inneren Organe. Candidiasis mit dem Befall von Haut, Schleimhäuten und inneren Or-

ganen, Torulopsidose mit dem Befall von Haut und Schleimhäuten und Cryptococcose mit der Infektion von Haut und inneren Organen, besonders dem Zentralnervensystem, werden durch eine Vielzahl von entsprechenden Erregerarten verursacht. Alle diese Krankheiten tragen außerdem die Gefahr in sich, unter bestimmten Bedingungen zu generalisieren. Ferner werden am Menschen nicht selten auch rote Rhodotorula-Hefen gefunden, die aber harmlos sind.

Für die Behandlung dieser vielgestaltigen Erkrankungen und für die Bekämpfung dieser pathogenen Keime kommen, je nach Ursache, Verlauf, Lokalisation, ganz verschiedene Antimykotika in Frage, so daß die Isolierung und genaue Differenzierung der Erreger eine spezifische Therapie ermöglichen. Deshalb sind die Hefepilzkrankungen der Haut, der Haare und der Nägel sowie die Systemhefemykosen in unseren Breitengraden seit der Entdeckung von Nystatin und Amphotericin B in therapeutischer Hinsicht, aber auch durch die Verwendung von Kaliumtellurit und durch die Entdeckung von Actidione in diagnostischer Hinsicht für den Kliniker, Praktiker und die Allgemeinheit aktueller geworden. Da heutzutage in modernen mykologischen Laboratorien routinemäßig Actidione, aber auch wieder mehr Kaliumtellurit zur Diagnostik von Hefe- und Pilzkrankungen verwendet wird, will diese Arbeit die Wirkungen der vorgenannten Substanzen auf imperfekte Hefen und mögliche Grenzen in ihrer diagnostischen Verwendbarkeit in vitro aufzeigen.

1.2. KALIUMTELLURIT IN DER LITERATUR

1.2.1. Toxizität von Kaliumtellurit

Kaliumtellurit besitzt eine hohe Toxizität ähnlich wie das fast gleich verwendbare Selenit und soll deshalb nur

in stark verdünnten Lösungen verwendet werden.

Die hohe akute Toxizität von Natriumtellurit (LD_{50}) und analog von Kaliumtellurit für den Menschen wurde bekannt, als es versehentlich drei Patienten statt Natriumjodid zur retrograden Pyelographie gegeben wurde. Zwei Patienten starben innerhalb von sechs Stunden nach Erbrechen, starker Cyanose und nachfolgender Bewußtlosigkeit (KEALL et al. (59)-). Bei der Sektion bestanden Degeneration der Leber und Stauung der inneren Organe. Im Blut war flüchtiges Alkyltellurit nachweisbar. Die zugeführte Menge Natriumtellurit betrug etwa 2 g.

Peroral scheinen Tellurite weniger gefährlich zu sein. HANSEN (45) nahm täglich 0,4 - 0,9 g Kaliumtellurit 7 Tage lang. Er beobachtete in den ersten Tagen lediglich etwas Benommenheit, später Appetitlosigkeit, Übelkeit, Herzklopfen und Herzbeschwerden. Der charakteristische Knoblauchgeruch und -geschmack soll 7 Wochen angehalten haben. (Im Vergleich dazu enthalten 100 ml einer 1 %-Lösung 1 g und 100 ml einer 2 %-Lösung 2 g Kaliumtellurit).

Die Toxizität von Tellur und seinen Verbindungen scheint geringer zu sein als diejenige von Selen und seinen Verbindungen. Deshalb ist es angebracht, im mykologischen Labor mit Kaliumtellurit anstatt mit Kaliumselenit, das ebenfalls in der Laboratoriumspraxis verwendet werden kann, zu arbeiten. Allerdings sind Selenverbindungen viel besser toxikologisch untersucht als Tellur (CERWENKA und COOPER (11)-).

Die charakteristische Eigenschaft dieser Tellurverbindungen ist, daß sie im Organismus leicht in Dimethyltellurid (CH_3)₂Te übergeführt werden. Dadurch bekommen Schweiß, Expiration und Harn für lange Zeit einen starken Knoblauchgeruch. Dieser Geruch ist bereits weniger als 2 Stunden nach der einmaligen Einnahme von 0,5 µg Tellurdioxid bemerkbar und hielt bei Selbstversuchen von REISERT (94) nach Einnahme von 15 mg etwa 237 Tage lang an.

Dieser äußerst störende Geruch der Atemluft, des Schweißes und des Harnes ist das wichtigste Symptom einer Vergiftung und kann sehr leicht erkannt werden, wodurch längere Exposition und Schädigung, vor allem in der Industrie, praktisch immer verhindert werden können. Weitere Symptome einer Tellurit- oder Selenit-Vergiftung sind nach Resorption größerer Mengen Kopfschmerz, Übelkeit, Schwäche, Benommenheit, Atem- und Herzbeschwerden, Hautjucken, Depressionen und Somnolenz (BROWNING (9); SHIE und DEEDS (108)-). Die Ausscheidung erfolgt durch den Harn (STEINBERG et al. (114)-). Die äußerst starke Belästigung durch den Geruch des im Organismus gebildeten Dimethyltellurid ist also das einzige hygienische Problem. Der Geruch soll durch Vitamin C-Gaben (750 mg 3 x täglich) verhütet werden. Er tritt aber bei frühzeitiger Unterbrechung wieder auf (MEIO (79); MEIO und ZETTER (80)-). AMDUR (3) empfahl zur Beseitigung des Geruches BAL-Injektionen (2,5 mg/kg, deren 4-stündliche intramuskuläre Injektion 6 Tage lang auch bei etwaigen Vergiftungen). Sie stellte aber 1958 im Tierversuch fest, daß nach der intravenösen Injektion von Telluriten die Nieren- und Leberschädigung verstärkt wurde und die Sterblichkeit erhöht war, wenn die Tiere mit BAL behandelt wurden.

Natriumtellurit und analog Kaliumtellurit besitzen im Tierversuch eine sehr hohe Toxizität (LD_{50} von 2,25 mg/kg) und wären danach im Tierversuch noch toxischer als das Selenit (LD_{50} von 3 mg/kg) (FRANKE und MOXON (27)-).

Allgemein kann man sagen, daß die löslichen Tellurverbindungen wie Kaliumtellurit giftiger sind als das elementare Tellur, da früher ohne große Nebenwirkung Suspensionen von metallischem Tellur in Glucose intramuskulär zur Behandlung von Lues verwendet wurden (FOURNIER und LEVADITI (26)-).

Trotz der Gefährlichkeit von Kaliumtellurit bleibt aber hier festzustellen, daß es in den im Labor verwendeten Lösungen und Mengen völlig ungefährlich bei sachgemäßer Anwendung ist.

1.2.2. Kaliumtellurit in der Bakteriologie

Auf Untersuchungen von BEYER (8) und HANSEN (45) zurückgreifend, hat GOSIO schon 1905 (36) feststellen können, daß alkalische Tellurite auf einige Mikroorganismen wirken. Wenn man die Telluritkonzentration unterhalb schädigender Dosen hielt, zeigte sich, daß die meisten Bakterien in der Lage sind, die alkalischen Tellurite zu zersetzen und das farblose, wasserlösliche Kaliumtellurit (K_2TeO_3) zu schwarzem, amorphem Tellur zu reduzieren. Durch diese Einlagerung in ihr Plasma erhalten die Bakterienzellen eine Pigmentierung, die je nach Konzentration des Kaliumtellurits die Kolonien makroskopisch grau bis tiefschwarz erscheinen lassen ("biotellurische Reaktion"). Diese Methode GOSIOS', in Untersuchungsmaterialien eventuell unerwünschte Keime durch Kaliumtellurit zu färben und damit erkennbar zu

machen, blieb aber zunächst unbeachtet und konnte sich in den Laboratorien nicht durchsetzen.

Erst 1912 wurde von CONRADI und TROCH (13) das Kaliumtellurit wieder in die mikrobiologische Diagnostik eingeführt. So findet Tellurit heute in speziellen Nährböden zur Diphtheriediagnostik Verwendung. Während das *Corynebacterium diphtheriae* erst bei höheren Konzentrationen von K_2TeO_3 im Wachstum gehemmt wird, also relativ telluritresistent ist, tritt dagegen die Hemmung der anderen Bakterien und saprophytischen Begleitflora schon wesentlich früher ein und Pseudodiphtheriekeime können durch die fehlende Bildung schwarzer Kolonien davon abgetrennt werden.

Die mikrobiologisch-medizinische Literatur erwähnt bei den Problemen bakteriologischer und biologischer Aktivität Kaliumtellurit öfter (zit. nach JUNG und GERHARDT (51)-). Nach MORTEN und ANDERSON (81) reduzieren Mykobakterien sowie auch andere Corynebakterien als *Corynebacterium diphtheriae* das Kaliumtellurit. Ebenso wird, wie YAMAMURA und KAMAKORA (136) feststellen konnten, Kaliumtellurit auch durch die Stämme *Escherichia* und *Proteus* sowie *Staphylokokkus* reduziert. DAVIS und MUDD (17), STAIB (113) sowie NERMUT (83) berichten in Arbeiten, daß das schwarze, amorphe, im Plasma liegende Tellur, zu dem das Kaliumtellurit reduziert wird, auch im Lichtmikroskop gut sichtbar ist. 1956 gelang es YAMAMURA und KAMAKORA (136) aufzuklären, daß diese Reduktion auf enzymatischem Wege verläuft. Diese Erkenntnis bestätigte auch NERMUT (84), der die Reduktionsaktivität bei *Proteus vulgaris* verfolgte.

1.2.3. Kaliumtellurit in der Mykologie

Auf Grund seiner Hemmwirkung gegenüber Bakterien fand Kaliumtellurit auch immer mehr Eingang in die mykologische Nährbodentechnik. (CH'IN (12); DUNCAN (19)-). In die mykologische Forschung wurde es aber erst durch GÖTZ (38) eingeführt, um eine möglichst hohe Ausbeute an pathogenen Dermatophyten bei Züchtungsversuchen zu erlangen. Der Autor berichtete über gute Erfolge.

Eine 1-2 %ige wässrige Stammlösung hielt sich bei Kühlschranktemperatur unbegrenzt. In einer Konzentration von 0,01 - 0,1 % (100 - 1000 µg/ml) dem sterilisierten, etwas abgekühlten Nährsubstrat zugesetzt, leistet Tellurit durch Unterdrückung der bakteriellen Mikroflora gute Dienste bei der Isolierung pathogener Pilze aus klinischem Untersuchungsmaterial (GÖTZ und HERTLEIN (39); FARROCHZAD (21); HAUFE (46); GÖTZ et al. (41); SCHÖNBORN (105)-).

1.2.3.1. Wirkung auf Schimmelpilze und Dermatophyten

Über die direkte Beeinflussung von Dermatophyten und Schimmelpilzen durch Kaliumtellurit liegen nur wenige Arbeiten vor. Meist wird dieses Problem, das auch einer näheren Untersuchung wert wäre, nur am Rande und allgemein erwähnt.

GÖTZ (38) berichtet in seiner einführenden Arbeit nur, daß durch Zusatz von 400 µg/ml (0,04 %) Kaliumtellurit zum Nährboden das Bakterienwachstum stark eingeschränkt wird und die Ausbeute an gezüchteten Pilzen, vor allem Dermatophyten, merklich erhöht wird. In einer anderen Arbeit (40) schreibt er, daß durch den Einsatz von Ka-

liumtellurit in Verbindung mit Cycloheximid-Acti-dione-Agar vor allem auch ein gehäuftes Auffinden von *Trichophyton rubrum* zu erklären sei.

In einer weiterführenden Arbeit prüften GÖTZ und HERTLEIN (3) verschiedene Nährbodenzusätze in Grütz-Agar. Sie testeten je einen Nährboden mit Kaliumtelluritzusatz, mit Kaliumtellurit- und Acti-dionezusatz und einen mit Acti-dione-Penicillin-Streptomycin-Zusatz in gebräuchlicher Dosierung. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, daß der Nährboden mit Kaliumtellurit-Acti-dionezusatz die meisten positiven Kulturergebnisse aufwies, sowie die stärkste Wachstumshäufigkeit und die größte Anzahl an Reinkulturen. Dabei konnten sie ferner ein wesentlich unterschiedliches Verhalten der einzelnen Kolonien im mikroskopischen Aussehen auf den drei verschiedenen Nährböden und im Vergleich zum Normalagar nicht feststellen. Alle Pilzarten zeigten das gewohnte Aussehen.

SCHÖNBORN (105) gelang es, die Ausbeute an Dermatophytenkulturen aus mikroskopisch positivem Hautmaterial allein durch Zusatz von 300 µg/ml (0,03 %) Kaliumtellurit zu Malz-Pepton-Glycerin-Agar von etwa 40 % auf 74 % zu steigern. Die Autorin berichtet weiter, daß Schimmelpilze und Dermatophyten auf Telluritagar ohne auffällige Beeinträchtigung ihrer Entwicklung wachsen. Sie sind ähnlich wie Bakterien in der Lage, Tellurite zu reduzieren und das schwarze Reduktionsprodukt in Form staubfeiner oder grobscholliger Niederschläge im Substratmycel abzulagern. Dabei kam es jedoch nur in Ausnahmefällen zu intensiverer Verfärbung der gesamten Pilzkultur. Eine Konzentration von 100 - 1000 µg/ml (0,01 - 0,1 %) unterdrückte das Wachstum der Dermatophyten nur

unwesentlich. HAUFE (46) fand bei einer zufälligen Beobachtung, daß auch *Sporotrichon Schenckii* auf Nährboden mit Kaliumtelluritzusatz reduktionsfähig war, ohne aber die Ablagerungen in den verfärbten Mycelien näher zu untersuchen und zu beschreiben.

JUNG und GERHARDT (51) konnten mit Hilfe von Kaliumtellurit, das dem Bierwürze-Agar als Redoxindikator zugegeben wurde, reduzierende Systeme im Pilzmycel von Dermatophyten nachweisen. Sie fanden die Tellurniederschläge ausschließlich in den vom Nährboden umschlossenen Mycelien, niemals im Luftmycel und stets nur in der Mitte der Hyphen. Die Intensität der Verfärbung nahm mit der Versuchsdauer zu.

1.2.3.2. Wirkung auf Hefepilze

Im Gegensatz zur Wirkung von Kaliumtellurit auf Dermatophyten und Schimmelpilze ist über seine Wirkung auf Hefen und hefeähnliche Pilze in der Fachliteratur mehr zu finden.

Ausführlich berichtete SCHÖNBORN (105) über ihre Erfahrungen mit Kaliumtellurit in der mykologischen Laboratoriumspraxis. Nach ihren Ergebnissen zeigten Sproßpilzkolonien im Gegensatz zu Dermatophyten und Schimmelpilzen je nach ihrer Fähigkeit zur Telluritreduktion und Tellurspeicherung eine graue bis schwarze Pigmentierung. Mitunter blieb ein heller Randsaum ausgenommen. Nach ihrer Meinung erlaubte der Farbton unter gewissen Einschränkungen sogar gewisse Rückschlüsse auf die Spezieszugehörigkeit der zu differenzierenden Hefe, z.B. erschien *Torulopsis famata* stets in grau-weißlichen Kolonien, während *Rhodotorula mucilaginosa* fast schwarz

aussah. Cryptococcus-Arten nahmen vielfach eine bleigraue Färbung an. Bei mikroskopischer Betrachtung der untersuchten Sproßpilze machten sich zumeist keine graduellen Unterschiede im Tellurspeichungsvermögen einzelner Zellen bemerkbar. SCHÖNBORN beobachtete, daß lediglich Vertreter der Gattung Cryptococcus und Rhodotorula sich durch gleichzeitiges Vorhandensein aller Übergänge zwischen nahezu schwarz pigmentierten Zellen und solchen, die nur vereinzelte Tellurkörnchen aufwiesen, auszeichneten. Nach JUNG und GERHARDT (zit. nach SCHÖNBORN) ist dieses Verhalten Ausdruck einer unterschiedlichen Fermentaktivität der Zellindividuen einer Population. SCHÖNBORN fand weiter, daß Hefezellen mit hochgradiger Tellurablagerung keineswegs ihre Teilungsfähigkeit einbüßten. Sie gaben bei Subkultur auf telluritfreiem Nährsubstrat einen Teil ihres Pigments an die Tochterknospe weiter. Abschließend berichtete SCHÖNBORN, daß alle im dermatologischen Untersuchungsmaterial anfallenden Hefearten gegenüber 300 µg/ml (0,03 %) Kaliumtellurit (als Zusatz zu Malz-Pepton-Glycerin-Agar) resistent sind. Ihr Wachstum wurde niemals vollkommen unterdrückt, höchstens wuchsen die Kolonien im Vergleich zu einem gleichwertigen telluritfreien Substrat mit 1 - 2 Tagen Verzögerung. Mikroskopisch konnte auch sie feststellen, daß die Mycelphase zu Gunsten der Hefephase zurückgedrängt sein konnte. Laboratoriumstechnisch konnte sie bei der Verwendung von Kaliumtellurit hinsichtlich der Züchtung von Dermatophyten und Sproßpilzen keinerlei Nachteile finden, sondern sogar Vorteile : Hefepilze wuchsen in gut abgegrenzten Einzelkolonien von charakteristischem Farbton, der durch Tellurspeicherung in der Zelle hervorgerufen wird. Auf Grund dieser verschiedenartigen Pig-

mentierung war es möglich, Mischkulturen zu erkennen und davon Reinkulturen zu züchten.

HAUFE (46) machte Versuche auf Maltose-Agar mit 100 µg/ml (0,01 %) Kaliumtellurit. Hier fand er eine fast totale Unterdrückung des Bakterienwachstums, aber keine auffallende Hemmung des Hefewachstums. Auch er konnte zeigen, daß die Hefekolonien infolge der Fähigkeit zur Reduktion des Tellurits auf dem Nährboden einen grauen bis schwarzen Farbton mit einem deutlich weißen Randsaum tragen. Ferner schrieb er, daß das Wachstum der Hefen und hefeähnlichen Pilze durch Tellurit in Abhängigkeit von der Konzentration mehr oder weniger gehemmt wird, wobei die Kolonien aber durch Förderung der Zellteilung mehr hefeähnliches Wachstum zeigten.

KAFFKA (56) untersuchte das Wachstum von *Candida albicans* auf Clauberg-II-Serum und einem durchsichtigen Serum-Tellurit-Agar. Dabei fand er, daß *Candida albicans* sich durch ein besonderes Kolonienwachstum auszeichnete und durch die Bildung der *Candida*-Wuchsformen (Pseudomycel und Chlamydosporen) schon nach kurzer Zeit differenzieren ließ. Daß *Candida albicans* typische Wachstumsformen bildete, führte er einerseits auf das ungenügende Nahrungsangebot sowie auf den reduzierten O₂-Gehalt beim Wachstum unter der Nähroberfläche zurück. Interessant ist eine dritte Deutung, daß die SH-Gruppen enthaltenden Enzyme, welche die Zellteilung bewirken, durch Tellur blockiert würden und es infolgedessen zum Wachstum von Hyphen käme, womit er sich gegen die von den meisten anderen Autoren vertretene Meinung stellte.

STAIB (113) untersuchte *Trichosporon cutaneum*-Kulturen

bei Kaliumtelluritzusatz und fand, daß durch diesen hefeartigen Pilz Kaliumtellurit zu schwarzem amorphen Tellur reduziert wurde. Die reduzierenden Systeme schienen nicht diffus über die Hyphen verteilt zu sein, sondern teils in regelmäßiger Anordnung, teils in unregelmäßiger Anordnung vorzukommen.

JUNG und GERHARDT (51) konnten feststellen, daß bei *Rhodotorula mucilaginosa* typisch schwarze Tellurablagerungen nur in einzelnen Hefezellen vorkommen, da stets nur ein Teil der Zellen aktiv ist und reduziert.

GIAMBANCO und BAUSINI (34) teilten mit, daß *Candida lipolytica* Kaliumtellurit bzw. Natriumtellurit zu metallischem Tellur reduziert. Diese Reduktion konnte durch Zugabe von Anti-SH-Verbindungen, durch 2.4-DPN und durch Phosphate verhindert werden, durch Methionin und Betain dagegen gesteigert werden.

Eine ausführliche Arbeit über die Wirkung von Kaliumtellurit und adäquat wirkender Stoffe stammt von NICKERSON und Mitarbeiter (87). Die Autoren beschrieben die Wirkung von Tellurit und dem fast gleich wirkenden Selenit auf Wachstum (definiert als eine irreversible Volumenzunahme) und Zellteilungsprozesse von verschiedenen hefeähnlichen Pilzen (*Candida albicans*, *Pullularia pullulans*, *Horniscium dermatidis* und *Geotrichum*). Als Medien verwendeten sie Glucose-Glycin-Yeastextrakt-Agar und arbeiteten ebenfalls mit sterilen, in H_2O gelösten Reagenzien. Sie testeten Kaliumtelluritkonzentrationen von $10^{-5}M \sim 2,7 \mu g/ml$ (0,00027 %), $10^{-4}M \sim 27 \mu g/ml$ (0,0027 %) und $10^{-3}M \sim 270 \mu g/ml$ (0,027 %) und lasen nach ein, zwei und fünf Tagen ab. Sie fanden,

daß durch Tellurit und Selenit das Wachstum von hefe-ähnlichen Pilzen mehr oder weniger ansteigend mit wachsender Konzentration gehemmt wird und diese Pilze keine Hyphen bilden, sondern hefeähnlich wachsen. Diese Wirkung beruht nach ihrer Auffassung nicht auf einer Hemmung der Hyphenbildung, sondern auf einer Förderung der Zellteilung. Die Kulturen waren intensiv schwarz gefärbt wegen der Produktion von schwarzem, metallischem Tellur als intracellulärem Reduktionsprodukt. NICKERSON und Mitarbeiter haben weiter beobachtet, daß Natriumselenit und Kaliumtellurit bei *Candida albicans* die Bildung von *Pseudomycel* unterdrückten. Bei der pseudomycelbildenden Mutante wird dadurch Sproßzellbildung bewirkt. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß an Protein gebundenes Tellur in reduziertem Zustand (H-Te-Gruppen) nur schwer oxydierbar ist im Gegensatz zu organisch gebundenem Schwefel, der zum größten Teil oxydiert in Form von Disulfidbindungen vorliegt. Die zellteilungsfördernde Wirkung der Tellurverbindungen war verständlich, da sie annahmen, daß ein Teil des in dem Protein der Zellwand vorhandenen Schwefels durch Tellur verdrängt wurde und das Protein dadurch in die reduzierte plastische Form überging. (Die Bezeichnung Zellteilung bedeutet bei NICKERSON Bildung abgegrenzter, kurzer Sproßzellen).

1.3. ACTI-DIONE IN DER LITERATUR

1.3.1. Toxicität von Acti-dione

Außer im mykologischen Labor für die kulturelle Pilzdiagnostik wurde Acti-dione auch in der Klinik therapeutisch angewandt (TURNER (119)-). Man setzte es ge-

gen Cryptococcose, Histoplasmose, Blastomykose, Candidose und Sporotrichose ein. Nach THURNER (119) erzielten aber fast alle Kliniker bei ihren Versuchen negative Resultate.

Im Tierversuch wurde von URI (123) festgestellt, daß eine hohe einmalige Dosis akut toxisch wirkt, aber kontinuierliche geringere Gaben gut vertragen werden. Die akute Toxizität variiert von Tierart zu Tierart. Während Mäuse eine LD_{50} von 150 mg/kg Körpergewicht haben, beträgt sie bei Ratten dagegen nur 2 mg. Da akute hohe Gaben zu stark toxisch sind und chronische Gaben relativ gut vertragen werden, muß man bei der Beurteilung von Acti-dione immer zwischen akuter, sub-akuter und chronischer Toxizität unterscheiden.

Als Nebenwirkungen und Folgen von Acti-dionegaben zeigten sich Veränderungen des roten Blutbildes, Verlängerung der Prothrombinzeit, Erhöhung des Blutzuckerspiegels, während histologische Untersuchungen geschädigter Tiere degenerative Veränderungen an Leber, Niere, Pankreas und Magen-Darm-Trakt ergaben. Aus diesen Gründen verbietet sich auch eine therapeutische interne Anwendung.

Wie schon bei Kaliumtellurit, so muß man auch hier sagen, daß Acti-dione in den im mykologischen Labor verwendeten Lösungen und Mengen bei sachgemäßer Anwendung völlig ungefährlich ist.

Eine interne Vergiftung sollte sofort durch Brechenlassen des Patienten als erste Notmaßnahme bekämpft werden. Auf Grund von Tierversuchen hat sich auch bei

beginnenden menschlichen Vergiftungen eine Kombination von Hydrocortison und Orthoxin als wirksames Antidot erwiesen.

In der mykologischen Praxis ist nur zu beachten, daß Acti-dione die ungeschützte Haut mehr oder weniger reizen kann. Deshalb sollte man Hautstellen, die mit Acti-dione in Berührung kamen, sofort gründlich mit Seife und Wasser abwaschen.

1.3.2. Acti-dione als Antibiotikum

Wenn man unter Antibiotikum - wie hier gedacht - nur ein antibakterielles Mittel versteht, so ist Akti-dione gegen Bakterien nur sehr wenig aktiv, während es gegen Fungi sehr wirkungsvoll sein kann (WHIFFEN (132)-).

Die antibiotische Aktivität gegenüber den meisten Bakterien beginnt erst bei Konzentrationen von über 1000 µg/ml (0,1 %), während sie bei den meisten Fungi mit Ausnahme der humanpathogenen Pilze wesentlich niedriger liegt.

Wie bereits vorher schon erwähnt, wird Acti-dione deshalb im bakteriologischen Labor verwendet, um Bakterienkulturen durch Zugabe von nur 100 µg/ml (0,01 %) Nährmedium von Verunreinigungen durch Pilze freizuhalten oder um Bakterien aus schimmelpilz- oder hefehaltigem Material zu isolieren. Nach PHILLIPS und HANEL (92) wird dabei das Bakterienwachstum nicht beeinflusst.

ZANGGER (137) verwendete ebenfalls das antibiotisch-fungizid wirkende Acti-dione, um die häufig auftretenden Verunreinigungen von Tuberkulose-Kulturen durch wilde

Hefen zu bekämpfen. Bei einer Konzentration von 40 µg/ml (0,004 %) in der Nährlösung wurde das Wachstum von *Mycobacterium tuberculosis* in keiner Weise gehemmt, eine Verunreinigung durch wilde Hefen jedoch vollkommen verhindert. Aus demselben Grunde verwendet der Autor seitdem auch Acti-dione bei Resistenzprüfungen auf *Tuberculostatica* und *Antibiotica*.

1.3.3. Acti-dione als Antimykotikum

Während Acti-dione gegen Bakterien nur sehr wenig aktiv ist, zeigt es eine ausgezeichnete Wirkung gegen Fungi, insbesondere Schimmelpilze, aber auch Hefen. WHIFFEN (132) stellte allerdings fest, daß es gegen pflanzenpathogene Pilze sehr viel wirksamer als gegen tier- oder humanpathogene ist. So liegt die antibiotische Aktivität in vitro bei pflanzenpathogenen Pilzen zwischen 10 und 100 µg/ml (0,001 und 0,01 %), bei tierpathogenen Pilzen bis auf Ausnahmen wie *Cryptococcus neoformans* bei ca. 1000 µg/ml (0,1 %). Acti-dione hat ein sehr breites Wirkungsspektrum und wurde bisher vor allem als Fungizid im Pflanzenschutz eingehend geprüft.

Die Wirkungsweise der Fungizide und Antimykotika ist noch wenig geklärt. Wahrscheinlich werden sie durch die Sporen (selektiv) absorbiert und dringen mit dem Stoffaustausch in das Zellinnere ein; dort greifen entweder sie selbst oder ihre Derivate in Form von Antimetaboliten schädigend in den Zellstoffwechsel ein (FOERST (24)-).

Acti-dione kann man als fungistatisches Antimykotikum bezeichnen, wenngleich es auch unter bestimmten Bedingungen fungizide wirken kann (PEYNAUD und LAFOURCADE (91)-).

1.3.3.1. Wirkung gegen Schimmelpilze und Dermatophyten

Im medizinisch-mykologischen Labor bereiten die Schimmelpilze große Sorgen, da sie als Luftverunreiniger und Anflugkeime das Untersuchungsmaterial befallen und durch ihr rasches Wachstum eine Diagnose unmöglich machen können, indem sie die langsamer wachsenden Dermatophyten und Hefen überwuchern.

Nach der Entdeckung des Acti-dione verging noch eine Reihe von Jahren, bis es 1953 von GEORG (33) in die mykologische Diagnostik eingeführt und 1956 von FEGELER (22) zur Hemmung der Begleitflora empfohlen wurde. Heute wird Acti-dione in den meisten medizinisch-mykologischen Laboratorien verwendet.

Die selektiv schimmelpilzhemmende Wirkung wurde von vielen Autoren (GEORG (33); GÖTZ und HERTLEIN (39); PHILLIPPS und HANEL (92); FUENTES et al. (29); SHARVILL und TALBOT (107); URI und HERPAY (123)-) untersucht und bestätigt.

KACHNIC und KOVAC (53) verwendeten hauptsächlich 500 µg/ml (0,05 %) Acti-dione im Nährboden und konnten feststellen, daß das Wachstum der Schimmelpilze um das zwei- bis siebenfache verzögert wurde.

HAUFE (47) setzte einem Nährboden bei starker Verunreinigung Cycloheximid in Konzentrationen von 100 - 500 µg/ml (0,01 - 0,05 %) hinzu. Es hemmte die Schimmelpilze selektiv; aber nicht alle Schimmelpilzarten wurden dabei gehemmt.

ADAM und SCHWANKL (2) untersuchten die Resistenz der

Schimmelpilze und fanden, daß eine Konzentration von 300 µg/ml (0,03 %) die günstigste Wirkung erzielt. Die Schimmelpilze wurden zwar nicht vollkommen gehemmt, aber durch rasches Überimpfen auf einen weiteren Nährboden erhielten sie die Reinkultur der Dermatophyten. Dabei stellten die Autoren fest, daß vor allem *Penicillium*-Arten unter den resistenten Schimmelpilzen zu finden waren. Diese resistenten Arten waren auch gegen eine Konzentration von 1000 µg/ml (0,1 %) und darüber unempfindlich. Abschließend sind ADAM und SCHWANKL der Meinung, daß man an die Möglichkeit der zunehmenden Resistenz der Schimmelpilze gegen Cycloheximid denken muß.

Eine sehr umfassende Arbeit über die Wirkung von Actidione auf Pilze veröffentlichten ADAM und STEITZ (1) und stellten dabei fest, daß die Wirkung des Cycloheximids von der Antibiotikumkonzentration und der Empfindlichkeit des jeweiligen Stammes abhängig ist. Sehr stark beeinflusst wurden vor allem die Schimmelpilze, doch gab es auch hier Ausnahmen. Die Autoren sind der Ansicht, daß eine Konzentration von 300 µg/ml (0,03 %) für die mykologische Diagnose ausreicht, um nicht die Dermatophyten in ihrem Wachstum zu hemmen.

GEMEINHARDT (31), KIELSTEIN (61) und THURNER (119) prüften unterschiedliche Actidionkonzentrationen in ihrer Wirkung auf Schimmelpilze.

GEMEINHARDT (31) kam bei der Testung des Actidione zu dem Ergebnis, daß für fast alle untersuchten Schimmelpilze eine partielle Hemmung erst in Konzentrationen über 500 µg/ml (0,05 %) zu erwarten war. Für *Aspergillus*

niger reichte für die partielle Hemmung eine Konzentration von 250 µg/ml (0,025 %) und für die totale Hemmung wurde eine Konzentration von 500 µg/ml (0,05 %) gefordert.

KIELSTEIN (61) prüfte die Verwendbarkeit von Acti-dione für die selektive kulturelle Isolierung von Trichophyton-Arten und konnte zeigen, daß Acti-dione die Saprophyten hemmt, die spezifischen Dermatophyten aber nicht beeinflusst; mit dem Vorteil einer großen Konzentrationsbreite des Antibiotikums zwischen der Hemmung der Saprophyten und der der spezifischen Erreger (Parasiten) Er empfahl eine Konzentration von 500 - 700 µg/ml (0,05 - 0,07 %) Acti-dione.

TURNER (119) beobachtete vor allem das kulturelle Bild und stellte fest, daß sich das Erscheinungsbild der Schimmelpilze erheblich änderte, wenn Acti-dione ihr Wachstum nicht vollkommen unterdrückte. Es gab Schimmelpilze, die bei einer geringen Hemmung durch Acti-dione weiter Konidien bildeten und ihr charakteristisches Aussehen beibehielten. Andere wurden durch dieselbe Konzentration vollkommen gehemmt. Ferner gab es noch Schimmel, die dahingehend verändert wurden, daß sich zwar das Mycel bildete, die Konidien- oder Sporangienbildung aber ausblieb. Daraus resultierten makroskopische Formen, die eine Ähnlichkeit mit Dermatophyten-Kulturen hatten. Dies konnte auch von der Autorin mikroskopisch bestätigt werden.

FEGELER (22), KACHNIC (52), LOEWENTHAL (73) und FARROCHZAD (21) verglichen den Cycloheximid-Agar mit anderen Nährböden. FEGELER (22) hatte beim Vergleich von Grütz-Agar,

Ochsengalle-Agar und Cycloheximid-Agar auf dem Acti-dione-Agar die besten Ergebnisse.

KACHNIC (52) untersuchte einen Sabouraud-Glucose-Agar ohne Zusätze und mit Zusätzen von 30 E Penicillin, 10 E Streptomycin und 500 µg/ml (0,05 %) Acti-dione. Auf dem Agar mit Zusätzen konnte in wesentlich mehr Fällen eine Reinkultur isoliert werden. Er empfiehlt eine Konzentration von 500 µg/ml (0,05 %). Eine Hemmstoffkonzentration unter 100 µg/ml (0,01 %) sei unwirksam.

LOEWENTHAL (73) machte Vergleichsstudien auf Sabouraud-Glucose-Agar, Littman-Oxgall-Agar und Cycloheximid-Agar. Auf dem Acti-dione-Agar wurden 365 Dermatophyten, auf Oxgall-Agar 338 und auf Sabouraud-Agar 300 Dermatophyten von insgesamt 1067 Fällen isoliert. Auf dem Acti-dione-Agar wurden die wenigsten Verunreinigungen durch Schimmelpilze gefunden.

FARROCHZAD (21) machte vergleichende mikroskopische Untersuchungen auf Grütz III-Agar, Sabouraud-Maltose-Agar und Reis-Agar. Auch er erzielte auf dem Cycloheximid-Antibiotica-Agar die besten Züchtungsergebnisse, vor allem traten kaum Verunreinigungen durch Schimmel auf. Da das Wachstumstempo gut war, konnte eine relativ schnelle Diagnose gestellt werden.

MEINHOF und RIETH (78) machten sich die selektive Hemmwirkung des Acti-dione auf Schimmelpilze für die Gruppendiagnostik zu Nutze. Um den Erreger einer Mykose in die drei Gruppen Dermatophyt, Schimmelpilz und Hefe zuordnen zu können, legten sie drei Parallelkulturen auf drei Agararten an. Sie beimpften einen Griseofulvin-

Agar, auf dem keine Dermatophyten, aber Hefen und Schimmelpilze wuchsen; ferner einen Nystatin-Agar, auf dem keine Hefen wuchsen, aber Dermatophyten und Schimmelpilze und einen Acti-dione-Agar, auf dem Dermatophyten und Hefen gut, die Schimmelpilze aber entweder überhaupt nicht oder nur äußerst gering wuchsen. Dadurch war eine Trennung der Pilze in die großen Gruppen Hefen, Dermatophyten und Schimmelpilze möglich, die aus diagnostischen und therapeutischen Gründen für die Praxis notwendig ist.

Dermatophyten :

Die Wirkung von Cycloheximid auf Dermatophyten ist umstritten. Während einige Autoren der Ansicht sind, daß die Dermatophyten bei den gebräuchlichen Routinekonzentrationen eine geringe Hemmung erfahren, behaupten andere, daß sie keine Beeinflussung erfahren. Allgemein gehen die Meinungen über die Empfindlichkeit der Erreger der Systemerkrankungen gegen Acti-dione auseinander.

Vor allem ADAM und STEITZ (1), ADAM und SCHWANKL (2) und THURNER (119) warnten vor einer unbegrenzten Anwendung des Acti-dione. ADAM und STEITZ (1) fanden eine geringe Hemmwirkung bei den Dermatophyten durch Acti-dionekonzentrationen, die zur Hemmung von Schimmel- und Hefepilzen nötig sind. Auch hier beobachteten sie eine Abhängigkeit von der Konzentration und der Empfindlichkeit des untersuchten Stammes. Deshalb empfahlen diese Autoren auch nur eine Konzentration von 300 µg/ml (0,03 %) für die Routinediagnostik. ADAM und SCHWANKL (2) veröffentlichten, daß durch höhere Konzentrationen des Antimykotikums nicht nur Schimmelpilze, sondern auch Hefen und Dermatophyten in ihrem Wachstum beeinträchtigt wurden;

vor allem *Trichophyton mentagrophytes* wurde bei 500 µg/ml (0,05 %) deutlich in ihrem Wachstum beeinträchtigt. Deshalb empfahlen auch sie Zusätze von 100 - 500 µg/ml (0,01 - 0,05 %), wobei 300 µg/ml (0,03 %) die günstigsten Bedingungen lieferte. Ebenso berichtete auch KACHNIC (52) über gewisse Hemmeffekte auf Dermatophyten bei Konzentrationen über 1000 µg/ml (0,1 %).

THURNER (119) untersuchte das Wachstum von Dermatophyten auf verschiedene Agararten mit Acti-dionekonzentrationen von 1000 µg/ml, 500 µg/ml und 100 µg/ml (0,1, 0,05 und 0,01 %). Als Kontrolle dienten zusatzlose Platten. Untersucht wurden : *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *M. canis*, *M. gypseum* und *E. floccosum*. Bei einer Konzentration von 100 µg/ml (0,01 %) Acti-dione im Nährboden bemerkte sie keine Hemmung oder Abweichung. Bei 500 µg/ml (0,05 %) stellte die Autorin bei *E. floccosum*, *M. canis*, *Tr. Verrucosum* eine Wachstumsverzögerung um einige Tage fest. Mikroskopisch war die Konidienbildung normal. Die Konzentration von 1000 µg/ml (0,1 %) Acti-dione hatte bei allen Testpilzen einen verspäteten Beginn und ein verzögertes Wachstum des Mycels zu Folge. Auch die Konidienbildung war verspätet bei mikroskopischer Betrachtung.

Ein weiteres Ergebnis brachte WARZECHO (127). Er fand, daß Acti-dione auf *Trichophyton gypseum* = *Trichophyton mentagrophytes* eine deutliche wachstumsfördernde Wirkung hatte.

Im Gegensatz dazu konnte WHIFFEN (131) anhand ihrer Versuche zeigen, daß eine Acti-dionekonzentration von

100 µg/ml (0,1 %) keine deutliche Wirkung auf Dermatophyten hatte.

Ebenso berichteten URI und HERPAY (123), daß weder eine mikroskopische noch makroskopische Veränderung der Dermatophyten zu verzeichnen war, wenn Cycloheximid in den gebräuchlichen Konzentrationen von 100 - 500 µg/ml (0,01 - 0,05 %) verwendet wurde. Sie fanden zwischen der Hemmkonzentration der Saprophyten und der Hemmkonzentration der Parasiten eine Differenz.

KACHNIC und KOVAC (53) berichteten, daß die in Mitteleuropa üblichen Dermatophyten durch Acti-dione keine Wachstumsverlangsamung und keine Änderung in ihrem Aussehen erfahren. Nur *Trichophyton verrucosum* bildete auf Cycloheximidnährböden Kolonien mit veränderter Oberfläche; aber nachdem diese veränderten Kolonien auf zusatzlosen Nährboden überimpft wurden, erhielten sie wieder ihr typisches Aussehen.

GEORG (33), LOEWENTHAL (73), FARROCHZAD (21), ROSENTHAL und FURNARI (101), GÖTZ und HERTLEIN (39) und HAUFE (47) untersuchten jeweils mehrere und verschiedene Nährböden und konnten beweisen, daß die guten Züchtungsergebnisse von Dermatophyten erst durch den Cycloheximidnährboden möglich waren, in Abhängigkeit von dem Ausmaß der Verunreinigung des Untersuchungsmaterials. HAUFE (47) schrieb, daß Acti-dionkonzentrationen von 100 - 500 µg/ml (0,01 - 0,05 %) in vitro das Wachstum der meisten syprophytischen Pilze und Hefen, nicht aber der Dermatophyten und anderer pathogener Pilze hemmt.

GEMEINHARDT (31) untersuchte mehrere Dermatophyten (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton tonsurans*, *M. Audouinii*,

M. canis, M. gypseum, E. floccosum). Er verwendete eine Konzentrationsreihe von 30, 50, 100, 250, 500 µg/ml (0,003; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05 %) Acti-dione. Nach vier Wochen entstand bei allen geprüften Stämmen keine Wachstumsverzögerung im Vergleich zur Kontrollplatte.

KIELSTEIN (61) nahm als Nährmedium Malzextrakt-Dextrose-Agar. Als Testkonzentration nahm er 750 µg/ml (0,075 %). Er testete Trichophyton rubrum, Trichophyton verrucosum, Trichophyton quinckeanum, Trichophyton megninii und Mikrosporum gypseum. Mit Ausnahme von Trichophyton megninii hemmte Acti-dione keinen der Dermatophyten. Für die mykologische Diagnostik empfahl er 500 - 700 µg/ml (0,05 - 0,07 %) Acti-dione.

1.3.3.2. Wirkung auf Hefepilze

Hefen :

Acti-dione war lange Zeit das wirksamste Antibiotikum gegen Hefen; dabei ist es gegen die eigentlichen Hefen meist in wesentlich geringeren Dosierungen wirksam als gegen die imperfekten Hefen (WHIFFEN (131); PEYNAUD und LAFOURCADE (91); BEECH und CARR (6); VERONA und PICCI (126)-).

Vor allem in der Bier- und Weinindustrie wird es wegen seiner Eigenschaften bei Betriebskontrollen in Gärkellern verwendet, um eventuelle Verunreinigungen der Luft durch Keime bei gleichzeitiger Wachstumshemmung der Hefen nachweisen zu können (GREEN and GRAY (43); GRAY (42); STRANDSKOV und BOCKELMANN (116)-). Bereits in sehr niedrigen Konzentrationen hemmt es das Wachstum und den

Stoffwechsel der Hefen. Hefeart und Substrat spielen aber dabei eine Rolle (PEYNAUD und LAFOURCADE (91); BEECH und CARR (6)-), so daß die wirksamen Konzentrationen je nach Hefeart und Substrat etwa zwischen 0,5 und 10 µg/ml (0,00005 und 0,001 %) Substrat liegen. Mycosubtilin und Frequentin ist gegen Hefen ähnlich wirksam.

PEYNAUD und LAFOURCADE (91) untersuchten Acti-dione in der Wirkung auf *Saccharomyces*-Arten in Traubensaft und Wein. Bei Dosen von 0,2 µg/ml (0,00002 %) wirkte Acti-dione fungistatisch in Most und fungizide in Weinen. Sie schreiben ferner, daß Acti-dione in schwächeren Konzentrationen als die meisten antibiotischen Chemikalien wirkt und außerdem spezifisch ohne Reaktion auf Bakterien, weshalb es gut geeignet sei zur mikrobiischen Stabilisierung.

BEECH und CARR (6) fanden, daß Acti-dione einen Großteil der Hefen hemmte. Dagegen erwiesen sich *Lipomyces starkeyi*, *Kloeckera apiculata* und *Rhodotorula glutinis* als auffallend resistent. Von den fermentierenden Hefen war *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* die widerstandsfähigste.

GREEN und GRAY (43) veröffentlichten in einer Arbeit, daß bei einer Konzentration von 0,2 µg/ml (0,00002 %) eine vollständige Hemmung im Wachstum von Brauereihefen auftrat. Dagegen konnten sie selbst bei einer Konzentration von 20 µg/ml (0,002 %) keine Hemmung der Brauereibakterien feststellen.

In einer zweiten Arbeit (44) konnten sie obige Ergebnisse bestätigen und berichteten weiter, daß die Zusammen-

setzung des Mediums auf die fungistatische Wirkung des Acti-dione keinen Einfluß hatte.

GRAY (42) berichtete, daß die meisten Hefen bereits bei Konzentrationen von 0,5 - 1 µg/ml (0,00005 - 0,0001 %) Medium ausreichend gehemmt wurden und daher Acti-dione gut verwendbar sei bei der mikrobiologischen Kontrolle der Bierqualität.

STRANDSKOV und BOCKELMANN (116) stellten ebenfalls fest, daß Acti-dione das Wachstum der Hefen bei einer Konzentration von 1 µg/ml (0,0001 %) vollständig hemmte, während bei 0,3 µg/ml (0,00003 %) noch keine Hemmung zu sehen war. Die hemmende Konzentration war sowohl in flüssigen wie auch in festen Medien gleich. Selbst 10-fache Konzentrationserhöhungen hatten keinen Effekt gegen verunreinigende Bakterien.

KIELHÖFER und AUMANN (60) prüften die Wirkung des Acti-dione auf die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* und kamen zu dem Ergebnis, daß zur vollständigen Hemmung der Hefe etwa 20 - 300 µg/ml (0,002 - 0,03 %) notwendig waren.

SIEGEL und Mitarbeiter (110) bewiesen in ihren Untersuchungen, daß *Saccharomyces fragilis* resistent gegen Acti-dione war.

ZANGGER (137) beschickte Kirchner-Nährboden (Tuberkulose-nährboden) mit vier verschiedenen Acti-dionekonzentrationen und fand bei Konzentrationen von 40 und 30 µg/ml (0,004 und 0,003 %) Hemmung der "hauseigenen" wilden Hefen (Anflugkeime), während es bei Konzentrationen von 25 bzw. 20 µg/ml (0,0025 bzw. 0,002 %) schon nach 24 Stunden zu einer zunehmenden Trübung der Kulturen kam.

Imperfekte Hefen :

Bereits 1948 zeigte WHIFFEN (131), daß zur Hemmung der imperfekten Hefen im allgemeinen relativ hohe Konzentrationen nötig seien. So zeigte sich *Candida albicans* äußerst unempfindlich, da eine Hemmung erst bei Konzentrationen über 1000 µg/ml (0,1 %) zu verzeichnen war. Eine Ausnahme bildete der pathogene *Cryptococcus neoformans*, der durch Cycloheximid stark gehemmt wurde.

ADAM und SCHWANKL (2) erkannten, daß hohe Acti-dionekonzentrationen die Pseudomycelbildung von *Candida albicans* hemmen.

GEMEINHARDT (31) prüfte im Rahmen umfangreicher Untersuchungen die Wirkung des Acti-dione auf folgende Hefepilze : *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon cutaneum* und *Trichosporon capitatum* in den Konzentrationsstufen von 30, 50, 100, 250 und 500 µg/ml (0,003; 0,005; 0,01; 0,025; und 0,05 %). *Cryptococcus neoformans* und *Saccharomyces cerevisiae* wurden stark gehemmt; sie zeigten schon bei Konzentrationen von 30 µg/ml (0,003 %) Acti-dione kein Wachstum.

Candida parapsilosis reagierte bei Acti-dionekonzentration von 30 µg/ml (0,003 %) mit einer partiellen Hemmung, ab Stufe 500 µg/ml (0,05 %) mit einer totalen Hemmung. *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon capitatum* wurden durch die Konzentrationsreihe nicht beeinflusst. Mit einer partiellen Hemmung war erst in Konzentrationen über 500 µg/ml (0,05 %) zu rechnen.

KIELSTEIN (61), der nur die Konzentrationen von 750 µg Acti-dione/ml Nährboden (0,075 %) testete, kam zu einem entsprechenden Ergebnis.

VERONA und PICCI (126) fanden als hemmende Konzentrationen von Acti-cione für *Cryptococcus neoformans* 25 µg/ml (0,0025 %), für *Rhodotorula glutinis* 30 µg/ml (0,003 %), für *Torula utilis* 100 µg/ml (0,01 %) und für *Candida albicans* über 1000 µg/ml (0,1 %).

Da die bis dato berichteten Erfahrungen über Cycloheximid als Nährbodenzusatz zu Pilznährböden nicht einheitlich waren, versuchten ADAM und STEITZ (1) in einer ausführlichen Arbeit vor allem der unterschiedlich beantworteten Frage nachzugehen, wieweit Sproßpilze in ihrem Wachstum einer Beeinflussung durch Acti-dione unterliegen. Sie arbeiteten mit Sabouraud-Maltose-Agar-Basalmedium und legten eine Kulturreihe ohne Zusatz, eine Reihe mit Neomycinzusatz und eine dritte Reihe mit Zusatz von 0,5 mg Neomycin und 500 µg Acti-dione/ml (0,05 %) an. Neben Schimmelpilzen und Dermatophyten testeten sie Hefen und hefeähnliche Organismen wie *Candida species*, *Candida albicans*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Trichosporon* und askosporogene Hefen und kamen zu dem Ergebnis, daß praktisch alle Hefen mit Ausnahme von *Candida albicans* beeinflusst wurden. Bei *Candida albicans* fanden sie nur in vereinzelten Fällen ein geringeres Wachstum, aber durchgehend eine starke Verringerung der Pseudomycelbildung, und zwar in recht weitgehend quantitativer Abhängigkeit von der Cycloheximidkonzentration, bei Zusätzen von 100; 300; 500 µg Acti-dione/ml Nährboden (0,01; 0,03; 0,05 %).

Rhodotorula und *Torulopsis* waren bis auf je einen Stamm

auf dem 500 µg Acti-dione/ml (0,05 %) enthaltenden Nährboden vollständig gehemmt.

Trichosporon zeigte die stärksten makroskopischen Veränderungen : Die sonst gewundenen Oberflächen erschienen auf Cycloheximid flacher. Auf Nährböden mit 500 µg/ml (0,05 %) war die Wachstumshemmung stärker als auf Nährböden mit 100 µg/ml (0,01 %). Eine fast genauso starke Wachstumshemmung und einen Pseudomycelbildungsrückgang fanden sie auch für *Candida tropicalis* auf diesen beiden Nährböden. Abschließend teilten sie noch mit, daß die Wirkung von Acti-dione auf das Wachstum der Testpilze einerseits von der angewandten Antibiotikumkonzentration, andererseits von der Empfindlichkeit des jeweiligen Pilzstammes abhängig war. Schimmelpilze und hefeähnliche Organismen wurden stark beeinflusst, Dermatophyten und *Candida albicans* am wenigsten. Als optimale Konzentration für die Routinediagnostik empfohlen die beiden Autoren einen Nährboden mit 300 µg Cycloheximid/ml (0,03 %).

Auch FEGELER (22) hatte vorher schon darauf hingewiesen, daß alle Hefen mit Ausnahme von *Candida albicans* durch Acti-dione in ihrem Wachstum beeinflusst werden.

HAUFE (47; 48) beobachtete eine Hemmung von *Cryptococcus neoformans* ab 300 µg Cycloheximid/ml Nährmedium (0,03 %), während *Sporotrichon Schenckii* und *Candida albicans* nicht gehemmt wurden. Der Autor ging ferner auch noch kurz auf die mögliche Wirkungsweise von Acti-dione ein und berichtet, daß KIELHÖFER und AUMANN (zit. nach HAUFE (47)-) für *Saccharomyces carlsbergiensis* nachweisen konnten, daß die Wirkung des Acti-dione vermutlich auf einer voll-

ständigen Hemmung der Proteinsynthese neben einer relativ unspezifischen geringen Hemmung der Atmung herührt. HAUFE (47) vermutet, daß dieser Wirkungsmechanismus auch für andere Hefearten zutrifft, geht aber auch auf die Arbeit von CARTER und LOCKWOOD (zit. nach HAUFE (48)-) ein, die beweisen konnten, daß Acti-dione auch direkt lytisch auf das Pilzmycel einwirken kann.

ELORZA (20) und TRABER (121) veröffentlichten in Arbeiten, daß durch Acti-dione die DNS-Synthese vollständig gehemmt wird, während die Synthese von RNS, wenn auch reduziert, weiterläuft.

MAHLER und Mitarbeiter (76) berichteten, daß Acti-dione ein Inhibitor für die zytoplasmatische Proteinsynthese sei. Da aber zytoplasmatische und mitochondriale Vorgänge zusammenspielen, wirke es indirekt auch auf die Atmungskette in den Mitochondrien.

SOSKOVA und Mitarbeiter (112) fanden experimentell heraus, daß Acti-dione bei Hefepilzen die Proteinsynthese, Zellteilung und Entwicklung von Tochterzellen zu normalen Zellen hemmt, wobei die Regeneration zu normalen Zellen irreversibel gehemmt wird. Die Resistenz der Hefezellen gegenüber Acti-dione sei nicht durch Eigenschaften der Zellwand bestimmt. Sie bezeichneten die Wirkung von Acti-dione eher cytostatisch als cytozid.

2. M A T E R I A L U N D M E T H O D I K

2.1. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

In dieser Arbeit soll das Wachstum bzw. die Hemmung von imperfekten Hefen bei Einwirkung von Kaliumtellurit und Acti-dione untersucht werden.

Die bisherigen Untersuchungen über den Einfluß von Kaliumtellurit und Acti-dione wurden vorwiegend mit dem Ziel unternommen, die für die Diagnostik günstigen Konzentrationen herauszubekommen. Deshalb wurden meist nur Konzentrationen in einem engeren Bereich getestet; ebenso waren auch die Testpilze auf mehr oder weniger viele Arten aller drei Pilzgruppen begrenzt. Ferner wurden die Pilze immer nur auf Nährböden untersucht, die die Testsubstanzen direkt als Zusatz enthielten.

Die vorliegende Arbeit dagegen will folgende Gesichtspunkte beachten und beantworten :

1. Da die imperfekten Hefen klinisch immer bedeutsamer werden, will diese Arbeit die Wirkung beider Testsubstanzen auf eine umfassende Anzahl dieser Hefen, wie sie in der Routinediagnostik vorkommen, untersuchen.

Das Ziel war, weitere Erkenntnisse für die bei uns angewandte mykologische Hefediagnostik zu gewinnen und zu prüfen, ob die Testsubstanzen Wirkungen hervorrufen, die zur schnelleren Differenzierung der Testpilze beitragen.

Deshalb werden bei den Untersuchungen die Arbeitsgänge eingehalten, die auch die mykologische Routinediagnostik macht.

2. Die Testpilze werden zuerst auf Kimmig-Schräg-Agarkulturen im Rahmen eines Reihenverdünnungstests geimpft. Dabei soll eine Konzentrationsreihe der beiden Testsubstanzen geprüft werden, die weiter als bisher beschrieben reicht. Hierbei steht die Frage im Vordergrund, wieweit die imperfekten Hefen in ihrem direkten Wachstum auf dem Testagar bei rein makroskopischer Ablesung verändert oder verzögert werden.
3. Wie im Routinebetrieb sollen dann die getesteten Pilze, nachdem sie auf kaliumtellurithaltigem und acti-dionehaltigem Kimmig-Agar gewachsen sind, auf Reisagar ohne Zusätze überimpft werden. Hier soll mikroskopisch untersucht werden, ob und wie die verschiedenen Konzentrationen die Ausbildung der morphologischen Formen bei bestimmten imperfekten Hefen (*Candida species*, *Trichosporon species*) verändern oder verhindern. Ferner soll geprüft werden, wieweit vorgeschädigt diese Hefen vor allem durch die Routinekonzentration sind und ob es dadurch im Rahmen der mykologischen Diagnostik zu Fehlern kommen kann oder ob sich die Pilze nach Aufhören der Einwirkung der Testsubstanzen wieder erholen.

2.2. VERWENDETE SUBSTANZEN

Tag für Tag werden in den mykologischen Laboratorien Kaliumtellurit und Acti-dione bei der kulturellen Züchtung von Dermatophyten und Hefepilzen verwendet, um die Erreger der häufigsten Pilzerkrankungen in vitro zu diagnostizieren. Daher ist es für den mykologisch

interessierten Mediziner und sein Hilfspersonal auch wichtig, einige allgemeine Daten über die verwendeten Substanzen und ihre Testobjekte zu wissen.

2.2.1. Kaliumtellurit

Der Grundstoff dieser anorganischen Verbindung ist das Tellur, ein silber- bis bräunlichgraues Metall. Beim Erhitzen entwickelt es einen unangenehmen, an "faulen Rettich" oder Knoblauch erinnernden Geruch, der auch allen Tellurverbindungen unter bestimmten Bedingungen anhaften kann, und ein wichtiges Symptom bei Telluritvergiftungen ist.

Herstellung :

Zur Herstellung von Kaliumtellurit gibt es mehrere Methoden, von denen aber nur die folgende rentabel ist und Verwendung findet.

Nach LENKER und WOLESENSKY (67) werden äquivalente Mengen Tellurdioxid (TeO_2) und Kaliumcarbonat (K_2CO_3) im Platintiegel zusammengeschmolzen. Um Oxydation zu Kaliumtellurat (K_2TeO_4) zu vermeiden, wird die Luft im Tiegel durch Kohlendioxid (CO_2)² verdrängt. Der dabei entstehende Stoff ist Kaliumtellurit (K_2TeO_3).

Eigenschaften :

Das kristalline Salz K_2TeO_3 (MG = 269,80) (GMELIN (35)-) ist ein farbloses, weißes, körniges, hygroskopisches Pulver. Es ist in Wasser mit alkalischer Reaktion sehr leicht löslich. Im mykologischen Labor wird es in steriler 1- oder 2 %-Lösung (10000 oder 20000 $\mu\text{g/ml}$) verwendet. Dabei ist zu beachten, daß diese Kaliumtellurit-

lösungen bei längerem Stehen an der Luft ausfallen, beim Erwärmen aber wieder in Lösung gehen (LENKER und WOLESENSKY (67)-). Da diese Lösungen ferner bei längerem Stehen in der Wärme quantitativ in Kaliumtellurat (K_2TeO_4) übergehen, ist es notwendig, sie nach Gebrauch stets wieder verschlossen in den Kühlschrank zu stellen. Dort kann man diese 1 - 2 %-Kaliumtelluritlösungen unbeschadet längere Zeit aufbewahren.

Verwendung :

Kaliumtellurit wird in hochverdünnten Lösungen zur Erkennung lebender pathogener Bakterien in Seren und dgl. verwendet; diese rufen durch Reduktion eine charakteristische Schwärzung hervor. Speziell in der Mykologie benutzt man Kaliumtellurit als Nährbodenzusatz an Stelle von Antibiotica zur Unterdrückung des bakteriellen Wachstums bei der diagnostischen kulturellen Züchtung von pathogenen Pilzen. Man nimmt dann 1- oder 2 % sterile (durch Bakterienfilter gefilterte) Kaliumtelluritlösungen, die man dem Nährboden in einer Konzentration von 300 µg/ml (0,03 %) zugibt. (SCHÖNBORN (105); HAUFE (46); NICKERSON et al. (87) u.a.). Dadurch erreicht man, daß das relativ schnelle, die Pilze überwuchernde Wachstum der Bakterien verhindert wird und die pathogenen Pilze wie Dermatophyten und Hefen kulturell zur Entfaltung kommen und diagnostiziert werden können. Gegenüber der Verwendung von Antibiotica wie Streptomycin oder Penicillin hat Kaliumtellurit den Vorteil, Bakterien zum Teil erkenntlich zu machen und ein wesentlich billigerer Nährbodenzusatz zu sein. Von gewissem Nachteil ist nur der knoblauchartige Geruch, der beim enzymatischen Abbau von Telluriten in Erscheinung tritt. Deshalb be-

nutzt man heute zur bakteriellen Hemmung von Pilzkulturen zumeist Antibiotica, in erster Linie Penicillin und Streptomycin. Andererseits bieten tellurithaltige Nährböden bei der Isolierung und Diagnostik der Pilze wesentliche Vorteile (z.B. diagnostisch zu verwertende Verfärbung der Kulturen), so daß ihre Verwendung im mykologischen Labor auch weiterhin gerechtfertigt ist (SCHÖNBORN (105)-). Erwähnenswert hierbei ist auch noch, daß Selenite adäquat verwendet werden können.

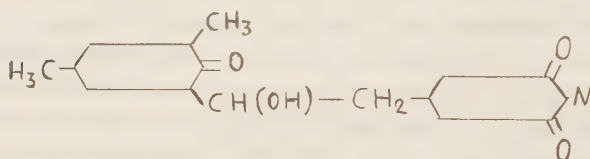
2.2.2. Acti-dione (Cycloheximid)

Das Antibiotikum Acti-dione ist wesentlich jünger in seiner mykologischen Verwendung als das Kaliumtellurit. WHIFFEN und Mitarbeiter (129) entdeckten 1946 bei einem *Streptomyces griseus*-Stamm die Bildung eines antimykotisch wirksamen Antibiotikums, das gegen eine Reihe von Pilzen wirksam war. Erst 1947 aber wurde es von LEACH und Mitarbeitern (66) aus dem Kulturmedium eines *Streptomyces griseus*-Stammes rein gewonnen, als sich zeigte, daß mehrere Arten von Streptomycin produzierenden *Streptomyces griseus*-Stämmen in ihren Nährlösungen noch ein anderes Antibiotikum enthielten, das die Entdecker Acti-dione nannten. Das reine Produkt fällt quasi als Nebenprodukt der Streptomycinerzeugung an, da nach Abtrennung des Streptomycins aus der Nährlösung Acti-dione in den Rückständen bleibt. Im Gegensatz zum Streptomycin stellte sich aber bald heraus, daß Acti-dione sehr effektiv gegen viele Hefepilze, aber weniger oder gar nicht aktiv gegen Bakterien ist (WHIFFEN (131)-).

1948 konnten FORD und LEACH (25) nach mehreren Untersuchungen in den Forschungslaboratorien der Upjohn-

Company die Summenformen $C_{15}H_{23}NO_4$ erarbeiten und aufdecken. Zugleich zeigte sich auch, daß es bei den Streptomyces griseus-Arten sehr große Unterschiede im Verhältnis der Produktion von Streptomycin und Acti-dione gibt und daß Acti-dione als Semicarbazon und als Acetat eine wesentlich größere Wirkung bekommt. Die Aufdeckung der Strukturformel gelang im Jahre 1949 den Forschern KORNFIELD, JONES und PARKE (64).

Die Strukturformel ist



und ordnet Acti-dione zu den Cycloheximiden. (Cycloheximid ist die freie internationale Kurzbezeichnung für Verbindungen wie Acti-dione). Chemisch ist dieses Cycloheximid, das unter dem Namen Acti-dione^R (Upjohn Co., Calamazoo - Michigan/USA) im Handel ist, ein (2-(3'5-Dimethyl-oxycyclohexyl) -2-hydroxyäthyl)glutaramid.

Herstellung :

Acti-dione kann durch aerobe Kultivierung von Streptomyces griseus in einer Nährlösung von Glucose, Malzextrakt, Pepton und NaCl gewonnen werden. Isoliert wird es durch Adsorption an Kohle, dann Elution mit 80 %igem Aceton, weiter gereinigt durch Gegenstromverteilung zwischen Benzol und Wasser und schließlich wird

es als Substanz rein erhalten. (WHIFFEN et al. (130)-).

Biosynthese :

Nach VANEK und Mitarbeiter (125) wird das Antibiotikum Cycloheximid aus sechs Malonateinheiten gebildet, von denen fünf decarboxyliert werden. Die beiden Methylgruppen des Moleküls stammen von Methionin ab. Die Biogenese des Glutaramidteils ist nicht stereospezifisch. Die einzelnen Schritte der Biosynthese wurden mit Hilfe von radioaktiven C 14 - Isotopen erforscht.

Eigenschaften :

Acti-dione ist ein gräulich-gelbes, körniges Pulver und sehr gut löslich in Chloroform, Aceton und Alkohol. Seine Wasserlöslichkeit beträgt 2 % unter saurer Reaktion. Acti-dione wird in alkalischen Lösungen rasch inaktiviert (UPJOHN COMPANY (122)-). In der Mykologie benutzt man es als Pulver oder in 1- oder 2 % Lösung (10000 oder 20000 µg/ml). Als Pulver kann man es bei trockener Lagerung sehr lange, aber unsteril aufbewahren; die sterilen Lösungen (durch Bakterienfilter gefiltert) dagegen bleiben für einige Wochen bei einem pH-Optimum von 3 bis 5 stabil. Auch hier empfiehlt sich zur Verlängerung der Verwendbarkeit eine Aufbewahrung im Kühlschrank.

Verwendung :

Acti-dione ist bei der Kultivierung und Isolierung von Dermatophyten und imperfekten Hefen aus klinischem Material heutzutage nicht mehr aus dem mykologischen Labor wegzudenken. Hier wird es in einer Konzentration von 500 µg/ml (0,05 %) als Nährbodenzusatz zur Unterdrückung des Wachstums unerwünschter Schimmelpilze ver-

wendet. Dadurch wird verhindert, daß diese Keime, die rascher als die pathogenen Pilze wachsen, das Wachstum von Dermatophyten und Hefen unterdrücken, wodurch gleichzeitig die Kultivierung und Differenzierung von Dermatophyten und Hefen ermöglicht wird (WHIFFEN (131); WHIFFEN et al. (129); GEORG et al. (32); ADAM und STEITZ (1) u.a.). Acti-dione diffundiert gut in den Nährboden und verliert auch nach Monaten nicht seine antibiotische Wirkung. Es muß aber unbedingt erst nach dem Autoklavieren dem Nährboden hinzugefügt werden, da es thermolabil ist.

Die Anwendung von Acti-dione als Nährmediumzusatz kann gewisse Schwierigkeiten bereiten, da durch höhere Konzentrationen nicht nur Schimmel, sondern auch Dermatophyten und Hefen beeinträchtigt werden können. Nach ADAM und SCHWANKL (2) liegt die optimale Konzentration zwischen 100 und 500 µg/ml Agar (0,01 und 0,05 %).

Acti-dione wurde 1953 von GEORG (33) in die mykologische Untersuchungstechnik eingeführt und 1956 von FEGELER als Pilzhemmungsmittel empfohlen.

Weitere Anwendungen :

In der Bakteriologie kann man Acti-dione in einer Konzentration von 100 µg/ml (0,01 %) Nährboden verwenden, um Bakterienkulturen von Verunreinigungen durch Pilze und Hefen freizuhalten (PHILLIPS und HANEL (92)-).

Acti-dione hat als Fungizid ein sehr breites Wirkungsspektrum und wurde daher im Pflanzenschutz eingehend geprüft. Bei Anwendung auf oberirdische Pflanzenteile treten oft erhebliche Blattschäden und Wachstumsstörungen

auf. Die wichtigste Anwendung ist die Bekämpfung der Blattfleckenkrankheit der Kirschbäume (FOERST (24)-). Nach FOERST (24) hat Acti-dione auch eine gute Wirkung gegen gewisse Rostkrankheiten bei Getreide, während LEWIN und Mitarbeiter (68) Acti-dione in der Forstwirtschaft bei der Bekämpfung des Blasenrostes mit gutem Erfolg benutzt haben. Außer im Pflanzenschutz wird Acti-dione auch als Rodent Repellent verwendet, wo es vor allem eine gute Wirksamkeit gegen Ratten besitzt (FOERST (24)-).

Ferner teilen mehrere Autoren, unter anderem KIELHÖFER (60) mit, daß Acti-dione heutzutage auch in der Bierbrauerei zur biologischen Betriebskontrolle herangezogen wird.

2.3. GETESTETE PATHOGENE, FAKULTATIV PATHOGENE UND APATHOGENE IMPERFEKTE HEFEN

Der größte Teil der menschenpathogenen Pilze findet sich unter den Dermatophyten, Schimmelpilzen oder Hefepilzen. Jede dieser Gruppe beinhaltet wiederum eine Vielzahl von pathogenen, fakultativ pathogenen und apathogenen Arten, so daß sich diese Arbeit zwangsweise auf eine einzelne Gruppe beschränken mußte. Da aber die Hefemykosen weit über das Gebiet der Dermatologie hinaus von klinischer Bedeutung sind und in mykologisch-klinischen Befunden immer noch zunehmen und da andererseits die antibiotische Wirkung von Acti-dione auf Hefen als erste bekannt war, boten sich gerade die imperfekten Hefen als Untersuchungsmaterial an.

Die wichtigste und größte Gattung der imperfekten Hefen ist die Gattung Candida. Zu dieser Gattung gehört auch

der klinisch bedeutsamste Hefepilz, *Candida albicans*, der Erreger des Soor (Candidiasis, Candidose, Candidamykose, Moniliasis, Oidiomykose, Soormykose).

Von den übrigen 68 *Candida*-Arten (*Candida species*) wird in der Klinik die pathologische Bedeutung von *Candida stellatoidea*, *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei* und *Candida pelliculosa* (Candidamykosen, Soormykosen) bewiesen und von anderen *Candida*-Arten noch diskutiert.

Aus der Gattung *Trichosporon* werden *Trichosporon cutaneum* (Trichosporose) und *Trichosporon Beigelii* (*Piedra aiba*) als fakultativ pathogen angesehen. Sie enthält 8 Arten.

Von der Gattung *Torulopsis* mit 36 Arten gelten *Torulopsis famata*, *Torulopsis glabrata*, *Torulopsis dattila* und eventuell noch andere Arten (Torulopsidosen) als fakultativ pathogen.

Die Gattung *Cryptococcus* (17 Arten) enthält den Erreger der "europäischen Blastomykose" (*Cryptococcose*, Morbus Busse-Buschke), *Cryptococcus neoformans*.

Den Arten der Gattung *Rhodotorula* (rote Hefen), die ebenfalls häufig am Menschen gefunden werden, kommt wahrscheinlich keine klinische Bedeutung zu (LODDER und KREGER VAN RIJ (72); RIETH (95) (100); KÄRCHER (54); KALKOFF und JANKE (57)-).

2.4. METHODIK

2.4.1. Untersuchungsmaterial - Gewinnung der Teststämme in Reinkultur und ihre morphologische Gattungsdifferenzierung

Untersucht wurden in dieser Arbeit, wie oben gesagt, nur die imperfekten Hefen. Dieses Pilzmaterial stammte aus dem täglich im mykologischen Labor der Dermatologischen Universitätsklinik München anfallenden Routineuntersuchungsmaterial von Patienten mit Mykoseverdacht.

Das Untersuchungsmaterial wurde mit sterilen Instrumenten (Skalpell, Schere, Feile, Pinzette je nach Lokalisation) von den betroffenen Hautstellen entnommen und in kleine Plastikschalen aufgenommen. (Das Untersuchungsmaterial wurde genommen, wie es gerade anfiel). Dabei wurde von jedem Patienten Datum und befallener Ort festgehalten.

Danach wurde das Material im Nativpräparat mykologisch untersucht. Lag ein Pilzbefall vor, so konnten Pilzfäden, Sporen und Sproßzellen nachgewiesen werden. Ein negatives Nativpräparat schloß aber einen Pilzbefall keineswegs aus, da vor allem die Sproßzellen der interessierenden imperfekten Hefen sich öfter dem mikroskopischen Nachweis entziehen können (RIETH (99); GÖTZ (40); SCHABINSKY (103); MEINHOF und RIETH (78); COUDERT (15); BENEKE (7)-).

Als nächster Schritt in der mykologischen Routineuntersuchung wurde das klinische Untersuchungsmaterial auf Kimmig-Testagar (siehe unten) in Schrägagar-Röhrchen

mit der sterilisierten und abgekühlten Platinnadel geimpft. Inokuliert wurden pro Patient und Material 2 Röhrchen, ein Kimmig-Schrägagar-Röhrchen mit Penicillin-Streptomycin-Zusatz und ein Röhrchen mit Actidione-Zusatz im Nährboden. Dann wurden die Röhrchen mit der nötigen Beschriftung versehen und bis zu 3 Wochen bei Zimmertemperatur in Ständern aufgehoben. Nach ca. 2 - 3 Wochen konnte man das Ergebnis des Wachstums ablesen, wo sich im allgemeinen dann die Diagnose Dermatophyt, Schimmelpilz oder Hefepilz stellen ließ.

Die Hefen konnte man an der runden Kolonieform, der weißlichen, roten oder gräulichen und gelben Farbe und der glatten, nicht glänzenden (im Gegensatz zu Bakterienkulturen !), manchmal auch schleimigen oder rauhen Oberfläche diagnostizieren. Jüngere Hefekolonien können manchmal mit Bakterien verwechselt werden, die aber in der Regel in kleineren, glänzenden Kolonien wachsen. Im Zweifelsfalle wurde auf einem Objektträger eine Aufschwemmung in einige Tropfen physiologischer Kochsalzlösung gemacht. Bei mikroskopischer Betrachtung ließen sich die größeren Hefezellen leicht von den Bakterien unterscheiden. Außerdem konnte man die Hefezellen durch ihre charakteristischen Sprosszellen erkennen, wobei die jüngere Zelle der älteren wie eine Knospe aufsaß (LODDER und KREGER VAN RIJ (72); KALKOFF und JANKE (57); WIMMER und HURLEY (135); FISCHER (23)-).

Gewinnung von Reinkulturen. - Reinzüchtung der Stämme.

Nachdem die "Grob"-Diagnose Hefepilz gestellt war, wurden zur weiteren Differenzierung von den Primärkulturen Reinkulturen angelegt. Dazu wurde von je einer Hefekolonie der Streptomycin-Penicillin-Röhrchen unter pein-

lichster Beachtung der Sterilität zur Vermeidung von Verunreinigungen mit der Platinöse ein Abstrich auf ein Kimmig-Schrägagar-Röhrchen ohne jeglichen Zusatz gemacht. Um ein gutes und üppiges Wachstum der Reinkultur zu bekommen (was für die weitere Arbeit wichtig war), wurde mit der Platinöse in Schlangenlinie über die Agaroberfläche gestrichen. Dies diente aber auch dazu, eventuelle spätere Verunreinigungen sofort zu erkennen. Die Abimpfung wurde deswegen nicht von den Acti-dione-Röhrchen vorgenommen, um die Hefen unbeeinflußt zu bekommen, da Acti-dione in den folgenden Experimenten als Testsubstanz verwendet wurde.

Bei der großen Häufigkeit der Hefen kamen oft Mischkulturen vor, die aus Pilzen verschiedener Gattung und Art bestehen. Durch die Addition von Eigenschaften in einer Mischkultur müßte es notwendigerweise zu Testverfälschungen kommen, die ein falsches Bild ergeben und zu falschen Schlüssen führen würden. Meist konnte man auf der Reisagar-Platte (siehe unten) den Befund Mischkultur nachweisen, wenn man sämtliche Formelemente in Betracht zog. Diese Mischkulturen wurden dann ausgesondert. Es wurden nur Reinkulturen zur Züchtung der Stämme und für die eigentlichen experimentellen Untersuchungen verwendet.

Nach ca. einer Woche waren die Hefen so stark herangewachsen, daß man von jeder Reinkultur genügend Material hatte, um die folgenden Testungen zu beginnen. Traten im Laufe der Zeit Verunreinigungen durch Schimmelpilze und Bakterien auf, so wurde der Teststamm sofort wieder auf ein frisches Agarröhrchen überimpft, um ihn in Reinkultur zu erhalten. Im Rahmen des experimentellen

Teils der Arbeit wurden die Stämme in regelmäßigen Abständen (ca. alle 4 - 6 Wochen) wieder auf neuen Kimmig-Agar überimpft, um sie vor Austrocknung zu bewahren und während der Arbeit stets frisch zu halten.

Gesammelt wurden so viele Stämme, bis eine repräsentative Anzahl erreicht war. Insgesamt wurden 187 Stämme getestet, davon gehörten 90 Stämme der Gattung *Candida* (52 *Candida albicans*-Stämme), 38 Stämme der Gattung *Torulopsis*, 20 Stämme der Gattung *Trichosporon*, 6 Stämme der Gattung *Cryptococcus* und 33 Stämme der Gattung *Rhodotorula* an.

Morphologische Gattungsdiagnose.

Die Einteilung der Hefepilze nach Gattung und Art erfolgte anhand ihrer morphologischen und physiologischen Merkmale (LODDER und KREGER VAN RIJ (72); DIDDENS und LODDER (18); RIETH (96), (95); KÄRCHER (55); FISCHER (23)-).

Da es bei der Differenzierung von Krankheitserregern vor allem auf eine sichere und schnelle Kultivierung und Identifizierung ankommt, um möglichst schnell mit der Therapie beginnen zu können, wurden im Laufe der Zeit die Methoden ständig verbessert und für spezielle Fälle erweitert. Dadurch bekam die medizinische Hefediagnostik einen großen Auftrieb, was auch dazu beitrug, daß dieser Zweig der Mikrobiologie der Forschung zugänglicher gemacht wurde (MALE (77); RIETH (96), (95); SWOBODOVA und CHMEL (117); MÜLLER et al. (82); SCHÖNBORN (106) u.a.).

Vor allem zur Identifizierung von *Candida*-Arten allge-

mein (SHOUTAU LIU (109); PAGANO et al. (90) u.a.) und speziell von *Candida albicans* als häufigstem Krankheitserreger (ROSENTHAL und FURNARI (101); NEWTON et al. (85); KAMINSKI und QUINLAN (58); GORDON und LITTLE (37); KUTSCHER et al. (65); SINSKI (111); TASCHDJIAN (118); WELD (128) u.a.) wurde eine Vielzahl von mehr oder weniger gebräuchlichen Methoden entwickelt.

Eine der elegantesten und meist verwendeten Methoden zur Identifizierung der gesammelten Hefestämme, die sich uns anbot, war die morphologische Differenzierung auf Reisagar, da sie eine sichere und schnelle Gattungsdiagnose erlaubte. Da ferner die Herstellung einfach war und schon nach 24 Stunden ausgewertet werden konnte, brachte diese Methode große Vorteile für die folgende morphologische Gattungsdiagnose (RIETH (100) u.a.).

Der sterilisierte, flüssige Reisagar wurde in Petrischalen gegossen und zwar so, daß eben der Boden bedeckt war. Der Agar war nach einem Tag beimpfbar. Dazu wurde die Reisplatte in 4 Sektoren eingeteilt, und in jedem Sektor wurde eine von den gesammelten Hefen mit der Platinnadel hauchdünn ausgestrichen und mit einem Deckglas abgedeckt. Nach 24 - 48 Stunden hatten sich meist dann die typischen Formen der imperfekten Hefen ausgebildet. Es wurde direkt durch die offene Petrischale mikroskopiert (Näheres siehe später !).

Anhand der charakteristischen Merkmale konnte man dann die Hefen differenzieren :

Blastosporen : Runde Sprosszellen, durch vegetative Vermehrung (Sprossung) entstanden. Meist ellipsoid, je

nach den äußeren Bedingungen viele morphologische Möglichkeiten. Meist einkernig; Plasma fein oder granuliert mit Vacuolen ("dancing bodies"), Mitochondrien und Plasmaeinschlüssen. Meist in Verbänden unter bestimmten Wuchsarten verbleibend. Bei allen Hefen vorhanden (BARNETT (5); NICKERSON und VAN RIJ (86)-).

Chlamydosporen: Abgerundete, aufgetriebene Sprosszellen, die am Ende von Pseudohyphen stehen. Starke körnige Innenstruktur, dickwandig und einen großen Tropfen fetten Öls enthaltend. Gelegentliche Dauerzellen als jüngste Zelle einer Pseudohyphe. Bei *Candida albicans* gilt diese Erscheinung als Merkmal, besonders bei älteren Kulturen oder unter bestimmten Umweltbedingungen (HAYES (49); WINDISCH (134); NORDBRING-HERTZ (89)-).

Pseudomycel (Pseudohyphen): entstehen dadurch, daß eine Zelle aus der anderen durch Sprossung hervorgeht, Ketten durch Aneinanderhängenbleiben bilden, wobei die Tochterzellen mehr oder weniger langgestreckt sind. Bildung von Seitenästen und Verzweigungen häufig. Der einzelne Faden heißt Pseudohyphe, die Masse davon bildet das Pseudomycel.

Unterschiede zu echtem Mycel :

- Einschnürungen an den Stellen, wo die Zellen zusammenstoßen;
- Quersepten werden nicht nachträglich eingezogen, sondern hier grenzt Zelle an Zelle;
- kein Spitzenwachstum, sondern die Zellen entstehen der Reihe nach durch Sprossung;
- beginnt mit dem begrenzten Längenwachstum der gesprosssten Tochterzelle;

- vor allem bei Candida-Arten mehr oder weniger üppig ausgeprägt (LODDER (70); NICKERSON und VAN RIJ (86); NICKERSON und FALCONE (88); WICKERHAM (133)-).

Arthrosporen: Mittelform zwischen Pseudomycel und Mycel bei Trichosporon-Arten. Langgestreckte Sprosszellen, die nachträgliche Querwände einziehen. Dann Zerfall der gemischten Hyphen-Pseudohyphen in Einzelzellen. Durch diese Entgliederung entstehen Gliedsporen, die sich nach dem Freiwerden abrunden und so beim Mikroskopieren oft mit Blastosporen verwechselt werden.

Arthrosporen entstehen also durch Zerfall rechtwinkelig septierten, echten Mycels (WINDISCH (134)-).

So war mit Hilfe der Reisplatte meist schon eine Gattungsdiagnose möglich. Im Falle der Candida albicans konnte sogar die Artdiagnose gestellt werden, da diese Hefe charakteristische Chlamydosporen bildete.

Morphologische Differenzierung und Einteilung :

Candida albicans (C.a.)

Sprosszellen rund, teils verschieden geformt und unterschiedlich groß; wenig Granulierungen.

Pseudomycel häufig gut ausgeprägt, relativ dicke Zellen. Oft unterschiedlich verzweigt.

Charakterisiert wird C.a. durch für sie mehr oder weniger starke Chlamydosporenbildung, die sie auf Reisagar von den übrigen Candida-Arten unterscheidet (LODDER und KREGER VAN RIJ (72); WINDISCH (134); WINNER und HURLEY (135); WELD (128); FUJJINO et al. (30); MACKENZIE (74); CORMANE und GOSLINGS (14)-).

Candida species (C.sp.)

In dieser Gruppe wurden alle übrigen Candida-Hefen zunächst zusammengefaßt. Sproßzellen zum Teil verschieden geformt, rund, meist mittelgroß, kaum Granulierung.

Pseudomycel bald mehr oder weniger deutlich vorhanden und bei manchen Arten üppig entwickelt und häufig verzweigt; meist dünne, unterschiedlich langgezogene Zellen. Pseudomycel zeigt oft kennzeichnenden Aufbau; abhängig vom Nährstoffangebot.

Vermehrung wie C.a. durch vielseitige Sprossung (LODDER und KREGER VAN RIJ (72); WINDISCH (134); DASTIDAR (16)-).

Trichosporon species (Tr.sp.)

Zellen von rund über oval bis langzylindrischer Form; granuliert zum Teil; groß. Mycel mit Arthrosporen (verschieden lang und dick), vereinzelt Pseudomycel mit Sprosszellen. Gattungsdiagnose durch die Erkennung von Arthrosporen gestellt.

Vermehrung durch Hyphenwachstum und Sprossung (LODDER und KREGER VAN RIJ (72); WINDISCH (134)-).

Torulopsis species (To.sp.)

Sprosszellen mehr oval als rundlich (Torula !), selten langgestreckt; wenig Granulierung im Plasma; Zellen ausnahmsweise umkapselt, mittelgroß - klein.

Pseudomycel fehlt (Gattungsdiagnose) oder höchstens primitiv vorhanden.

Vermehrung durch vielseitige Sprossung (LODDER und KREGER VAN RIJ (72); WINDISCH (134); RIETH (99)-).

Die Diagnose *Cryptococcus* und *Rhodotorula* konnte man bereits makroskopisch in der Schrägagarkultur stellen.

Cryptococcus species (Cr.sp.)

Die *Cryptococcus*-Gattung war durch die hellbräunlichen, schleimigen Kulturen auf festen Nährböden erkennbar. Differentialdiagnose gegenüber einigen *Torulopsis*-Arten durch positiven Stärketest (siehe unten).

Zellen sind typisch rund oder oval, zuweilen langoval oder unregelmäßig vielförmig; sehr stark gekörnt erscheint vor allem *Cryptococcus neoformans*.

Pseudomycel fehlend oder primitiv.

Vermehrung durch vielseitige Sprossung.

Stärkebildung in Form von Kapseln oder diffus (LODDER und KREGER VAN RIJ (72); WINDISCH (134); LODDER und de MINJER (71); SCHMIEDT et al. (104)-).

Rhodotorula species (Rh.sp.)

Sprosszellen rund, oval oder langgestreckt; gleichmäßig klein, blasses, fast unstrukturiertes Protoplasma.

Gelegentlich primitives Pseudomycel.

Ausgeprägte rote oder gelbe Farbstoffe (Carotinoide) werden gebildet.

Vermehrung durch Sprossung.

Wie bei *Cryptococcus species* wurde die Gattungsdiagnose ohne Reisuntersuchung durch die carotinoide Farbe der Kolonien gestellt. Differentialdiagnostisch waren rote

Bakterien abzugrenzen, die aber eine glänzende, wässrige Oberfläche im Vergleich zur mehr cremigen Oberfläche der *Rhodotorula species*-Kolonien hatten und ferner durch eine Kochsalz-Zellen-Suspension (siehe oben) davon abgetrennt werden konnten; weiter mußte man noch *Sporobolomyces*-Hefen davon unterscheiden, die aber unter dem Mikroskop starke Unregelmäßigkeiten der Zellform und Sprossung zeigten und außerdem durch eine grobe Granulierung auffielen (LODDER und KREGER VAN RIJ (72); WINDISCH (134); JANKE (50)-).

Bereits hierbei wurden die Pilze so in Testgruppen (Gattungen) eingeordnet, wie sie dann in den Experimenten untersucht wurden. Getestet wurde als Art zunächst nur *Candida albicans* (wegen seiner besonderen Wichtigkeit für die medizinische Mykologie). Die übrigen Hefen wurden in den Testungen zunächst als Gattung untersucht. Erst nach Abschluß aller Untersuchungen wurden die einzelnen Hefearten physiologisch bestimmt, um eventuelle Unterschiede einzelner Arten innerhalb einer Gattung zu erkennen und aufzuklären.

2.4.2. Verwendete Lösungen und Nährböden

Lösungen :

Da die Wirkung von Kaliumtellurit und Acti-dione auf die gesammelten Hefestämme untersucht werden sollte und diese Testsubstanzen routinemäßig nur auf diese Weise an Pilze herangebracht werden, wurden Kaliumtellurit und Acti-dione als Nährbodenzusätze getestet.

Kaliumtellurit stand nur in sterilen 1- und 2 %-wässrigen Lösungen zur Verfügung :

- Je nach Konzentration Kaliumtellurit in destilliertem Wasser lösen;
- Sterilisieren durch Filterung durch Bakterienfilter.

Acti-dione wird im mykologischen Routinebetrieb in unsteriler Pulverform der Einfachheit halber dem Agar als Nährbodenzusatz zugegeben (POLEMANN (93)-). Um aber entsprechend dem Kaliumtellurit adäquate Verhältnisse und Vergleichsmöglichkeiten zu erreichen, wurden bei den folgenden Untersuchungen ebenfalls 1- und 2%-wässrige Lösungen von Acti-dione hergenommen. Dies hatte neben der genaueren Dosierungsmöglichkeit auch den Vorteil der möglichst großen Sterilität :

- Verwendung des technischen Produkts, das billiger ist als das für therapeutische Zwecke;
- Je nach Konzentration Acti-dione in 5 - 10 ml Aceton lösen, dann mit destilliertem Wasser (eingestellt auf pH 6,5) auffüllen;
- Lösung durch Bakterienfilter filtrieren oder im Autoklaven für 15 Minuten bei 121°C sterilisieren (GEORG (33); UPJOHN COMPANY (122)-).

Die Lösungen wurden dann gemäß der gewünschten Konzentration dem Kimmig-Testagar zugegeben.

Beide Lösungen wurden von der Klinik-Apotheke bezogen.

Nährböden :

Entsprechend der Vielzahl der Pilzarten gibt es auch eine große Zahl von Nährböden, je nach den Wachstumsbedingungen der Pilze (GRÜTZ (zit.nach GÖTZ)(40); LITTMANN (69); VANBREUSEGHEM und VAN BRUSSEL (124);

SABOURAUD (102); KNOTH-BORN et al. (63) u.a.). Für die Rationalisierung im mykologischen Routinebetrieb sind jedoch Nährböden wichtig, auf denen fast alle bedeutenden pathogenen Keime wachsen können und längere Zeit am Leben bleiben. Dieser Bedingung entspricht heute der viel verwendete Kimmig-Testagar.

Testagar nach Kimmig :

Dieser Nährboden, auf dem sehr viele Pilze, vor allem Dermatophyten und Hefen gut wachsen, wird routinemäßig für diagnostische Zwecke (mit Penicillin-Streptomycin- und Acti-dionezusatz) und für Antimykotica-Tests (in diesem Falle mit Kaliumtellurit- bzw. Acti-dionezusatz) hergenommen. Es ist ein modifizierter Grütz II-Nährboden für die Prüfung der Pilzelemente im Untersuchungsmaterial und für die Subkulturen im Labor (KIMMIG und RIETH (62)-).

Rp. Glucose	10,0
Pepton	5,0
Glycerin	5,0
NaCl	5,0
Standard Nährbouillon II "Merck"	5,0
Agar-Agar	18,0
Aqu.dest.	ad 1000,0

S. An drei aufeinanderfolgenden Tagen je
30 Minuten im Dampftopf sterilisieren.

Der Agarzusatz ist absichtlich hochgehalten, um zu vermeiden, daß die Öse leicht im Agar steckenbleibt. Ferner ist der Glucosegehalt niedrig, um das Pleomorphwerden der Kulturen zu verhindern (RIETH (100)-).

Im ersten Teil der Untersuchungen wurde der Kimmig-Testagar mit den jeweiligen Konzentrationen der Testsubstanzen Kaliumtellurit bzw. Acti-dione als Nährbodenzusatz verwendet. Mit dem abgekühlten (ca. 50°C) flüssigen Agar (mit Testsubstanzzusatz) wurden dann Schrägagar-Röhrchen ausgegossen (ca. 5 - 7 ml Agar pro Röhrchen). Diese haben im Vergleich zu den ebenfalls verwendbaren Petrischalen den Vorzug, weniger anfällig für Verunreinigungen und Austrocknung zu sein. Die Röhrchen wurden dann mit einem Zellstopfen verschlossen. Nach ca. 24 Stunden konnte man sie dann beimpfen.

Im zweiten Teil der Experimente wurden dann die getesteten Hefen für die mikroskopische Untersuchung auf Reisagar (ohne Zusatz), einen Spezialnährboden für Hefen, übertragen.

Reisagar nach Taschdjian :

Wie bereits erwähnt, bietet die Verwendung von Reisagar zur morphologischen Untersuchung von Hefepilzen große Vorteile. Dieser Agar fördert die Ausbildung von Merkmalen, in denen sich die verschiedenen Hefegattungen unterscheiden, da er nährstoffarm ist. Auf nährstoffreichen Medien kann diese Morphologie nicht immer beobachtet werden. Erwähnt sei die Bildung von Mycel, Pseudomycel und Arthrosporen. Ferner läßt er bereits nach einem Tag die morphologische Untersuchung zu, ist einfach zu verwenden und erlaubt vor allem wegen seiner Farblosigkeit eine mikroskopische Untersuchung der Hefen durch die offene Petrischale hindurch.

Dadurch ist es möglich, die getesteten Pilze ohne Um-

weltveränderungen über mehrere Tage mikroskopisch zu betrachten und ihr Verhalten genau zu verfolgen.

Für die Herstellung eignet sich am besten Reis, der beim Kochen körnig bleibt, damit nicht zu viele Nährstoffe ins Substrat kommen (RIETH (95); TASCHDJIAN (118); RIETH et al. (98); RIETH et al. (97)-).

Rp. Reiskörner (sog."Brühreis"

oder japanischer Reis) 20,0

Agar-Agar 20,0

Leitungswasser zu 1000,0

S. Die Reiskörner mit Wasser bedecken und bei kleiner Flamme 45 Minuten kochen. Gefäß bedecken, nicht umrühren. Dann durch 4 Lagen Mull filtrieren (Reisschleim ausdrücken). Dann den Agar zum Filtrat geben und im Dampftopf erhitzen, bis der Agar flüssig ist. An drei aufeinanderfolgenden Tagen je 30 Minuten im Dampftopf sterilisieren (RIETH (100)-).

Der etwas abgekühlte Reisagar (50 - 60°C) wurde dann dünn in Petrischalen gegossen, damit er durchsichtig und farblos war für die mikroskopische Betrachtung der Kultur, die direkt von oben durch die Petrischale hindurch erfolgte. Die zu untersuchende Hefe wurde dann mit einer sterilen Platinöse sehr vorsichtig dünn in Z-Linie auf der Oberfläche verstrichen. Darauf wurde ein steriles Deckglas gelegt, um ein halb anaerobes Milieu zu erzeugen, wodurch vor allem die Chlamydosporenbildung begünstigt wird. Die Untersuchung der Kulturen erfolgte nach etwa 1 - 2 Tagen. Die Platten wurden bei 28°C im

Brutschrank aufbewahrt, wodurch einige Stunden gewonnen wurden (RIETH et al. (97)-).

2.4.3. Durchführung

Bereits bei der Disposition dieser Arbeit stand fest, daß sie aus zwei getrennten Hauptteilen besteht, nämlich der Untersuchung von Kaliumtellurit und der von Acti-dione. Für beide Substanzen wurden aber methodisch gleiche Verfahren angewendet. Auf Unterschiede wird im Rahmen der folgenden Erläuterungen selbstverständlich eingegangen.

2.4.3.1. Reihenverdünnungstest in der Schrägagarkultur

Zur Untersuchung der Resistenz bzw. Empfindlichkeit von Mikroorganismen gegenüber Antibiotica oder Chemotherapeutica gibt es zwei geläufige Methoden, den Agardiffusionstest (Hemmhofstest) und den Verdünnungstest. Während man den Hemmhofstest zur Beurteilung bei gleichzeitiger Testung von mehreren Antibiotica auf einen Erreger verwendet, wurde hier, da jeweils nur ein Stoff auf eine Vielzahl von Erregern hin überprüft wurde, der Verdünnungstest angewendet. Außerdem liefert er präzisere Resultate, ist aber auch etwas aufwendiger. Die Methode des Reihenverdünnungstests ist relativ einfach : Eine Verdünnungsreihe der zu prüfenden Substanz wird in Kulturröhrchen angelegt und jeder Konzentrationsstufe die gleiche Einsaatmenge der zu untersuchenden Erregerkultur beigegeben. Zur Kontrolle wird ein Röhrchen ohne Zusatz angelegt. Nach erfolgter Inkubation kontrolliert

man, ab welcher Stufe eine Hemmung bzw. die totale Wachstums hemmung stattfindet (TURNER (120)-).

2.4.3.1.1. Testverfahren beim Reihenverdünnungstest

Herstellung :

In dieser Versuchsreihe wurde als Nährboden der oben beschriebene Kimmig-Testagar verwendet. Der fertige Zusatzlose Agar wurde im Dampftopf sterilisiert und flüssig gemacht. Dann wurde er in 500 ml Gefäße abgefüllt und auf ca. 50°C abgekühlt. Dem sterilen und abgekühlten Nährmedium wurden dann die entsprechenden verschiedenen Testsubstanzkonzentrationen mit der Pipette zugesetzt und gründlich mit dem Agar vermischt. Dann wurde die jeweils benötigte Anzahl der Schrägagarröhrchen gegossen; ebenso wurden auch Reagenzröhrchen ohne Zusatz zur Kontrolle ausgegossen.

Acti-dione muß dem Nährboden nach dem Autoklavieren hinzugefügt werden, da es thermolabil ist. Ebenfalls wurde auch Kaliumtellurit erst nach dem Autoklavieren dem abgekühlten, sterilen Nährmedium zugegeben.

Durchführung :

Von jedem Kulturstamm der zu untersuchenden Hefen wurde dann ein Reihenverdünnungstest angelegt. Es wurde für jede Hefe ein Röhrchen ohne Zusatz als Wachstumskontrolle und ein Röhrchen für jede Konzentrationsstufe (Verdünnungsstufe) der Testsubstanz angelegt. Die Hefen wurden mit der sterilen, abgekühlten Platinöse in Schlangenlinie auf die Agaroberfläche fein und dünn überimpft, da sich dadurch das Wachstum gut beobachten läßt und mögliche Verunreinigungen sofort erkannt wurden. In diesem Falle

wurde der Versuch wiederholt. Das Wachstum erfolgte in Ständern bei Zimmertemperatur.

Kaliumtellurit-Screening :

Als Zusatz wurden verschiedene Konzentrationen der bekannten Lösungen verwendet :

- 1 % (10000 µg/ml) Kaliumtelluritlösung bzw.
- 2 % (20000 µg/ml) Kaliumtelluritlösung.

Die in der mykologischen Routine verwendete Konzentration beträgt 300 µg/ml (0,03 %). Von dieser Norm ausgehend, wurde eine Konzentrationsreihe getestet, die jeweils mit dem Multiplikationsfaktor bzw. Divisionsfaktor 2 oder 3 ansteigt oder abfällt. Dadurch war die Verdünnungsreihe kontinuierlich und der Unterschied zwischen den Verdünnungsstufen nicht zu groß. Überprüft wurden 5 Konzentrationsstufen, wie Tabelle 1 zeigt.

Tabelle 1 : Herstellung der Kaliumtelluritkonzentrationen für den Reihenverdünnungstest.

Konzentration in µg/ml	50	100	300	1000	2000	Kontrolle
in Vol. %	0,005	0,01	0,03	0,1	0,2	
Markierung der Stopfen	I	II	III	IV	V	0
Herstellung :						
Agarmenge in ml	500	500	500	500	500	500
dazu 1 %-Lösung in ml	2,5	5	15	50	100	-
2 %-Lösung in ml	-	-	-	25	50	-

Die hohen Konzentrationen der Reihe wurden jeweils mit der 1- und 2 %-Kaliumtelluritlösung untersucht, um zu überprüfen, ob die relativ hohen Verdünnungen der 1 %-Lösung andere Ergebnisse bringen als die weniger verdünnten Agarkonzentrationen der 2 %-Lösung.

Acti-dione-Screening :

Als Nährbodenzusatz wurden 1 %-Acti-dionelösung (10000 µg/ml) bzw. 2 %-Acti-dionelösung (20000 µg/ml) getestet.

Von den meisten Autoren wird für die Diagnostik eine Konzentration von 100 bis 500 µg/ml (0,01 bis 0,05 %) empfohlen; im hiesigen Labor wird eine Konzentration von 0,05 %, entsprechend 500 µg/ml verwendet. Da über diese Konzentration viele ausführliche Veröffentlichungen vorliegen, wurde sie in der Verdünnungsreihe nicht berücksichtigt.

So wurden in einem ersten Arbeitsgang zunächst die Konzentrationen 10, 100 und 1000 µg/ml (0,001; 0,01 und 0,1 %) getestet. Bei diesen Experimenten zeigte sich, daß es nicht nötig war, Zwischenstufen auszutesten. Daher wurde in einem zweiten Arbeitsgang obige Konzentrationsreihe nur erweitert, um die Konzentrationen 2000 und 4000 µg/ml (0,2 und 0,4 %). In diesem endgültigen Arbeitsgang wurde eine Verdünnungsreihe überprüft, die in ihren niedrigen Konzentrationen einen Multiplikationsfaktor von 10, in ihren hohen Konzentrationen einen von 2 besitzt. Das ermöglichte vor allem bei den hohen Konzentrationen bzw. großen Verdünnungen, wo eine Beeinflussung zu erwarten war, eine kontinuierliche Vergleichsmöglichkeit. Tabelle 2 erläutert die 5 Konzentrationsstufen dieser Testreihe.

Tabelle 2 : Herstellung der Acti-dionekonzentrationen
für den Reihenverdünnungstest.

Konzentration in µg/ml	10	100	1000	2000	4000	Kontrolle
in mg/ml	0,01	0,1	1	2	4	
in Vol. %	0,001	0,01	0,1	0,2	0,4	
Markierung der Stopfen	I	II	III	IV	V	0
<u>Herstellung :</u> ml Agar	500	500	500	500	500	500
dazu 1 %-Lösung in ml	0,5	5	50	100	200	-
2 %-Lösung in ml	-	-	-	50	100	-
Gewichtsmenge in mg Acti-dione	5	50	500	1000	2000	-

Auch hier wurde bei den hohen Konzentrationen jeweils mit der 1- und 2 %-Lösung getestet. Dadurch sollte überprüft werden, ob sich die Testergebnisse bei den hohen wässrigen Verdünnungen verändern oder gleich bleiben.

Außerdem wurde bei den hohen Verdünnungen der großen Konzentrationen (bei 0,2 und 0,4 %) dem Kimmig-Testagar statt 18 g Agar-Agar/1000 ml um 1/3 mehr, also 24 g zugegeben, um das Nährmedium fester zu machen und um gleiche Bedingungen innerhalb der Verdünnungsreihe zu erreichen.

Da viele Autoren ihre Acti-dionekonzentrationen in mg/ml angeben, wurde in obiger Tabelle neben den üblichen Konzentrationen stets auch die Acti-dionemenge pro ml Nährboden in mg angegeben.

2.4.3.1.2. Makroskopische Untersuchung

Die Ablesung erfolgte für alle Hefen unter Berücksichtigung des gesamten beimpften Bereichs visuell durch Vergleich mit der Kontrolle. Dabei wurden auch sämtliche Konzentrationen der Reihe nach aufsteigend miteinander verglichen. Diese Methode der Auswertung brachte den Vorteil mit sich, das Wachstum der Hefen während des Beobachtungszeitraumes nicht unterbrechen zu müssen.

Es wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen abgelesen. Ausgewertet wurde jeweils am 1., 2., 3., 5., 7. und 14. Tag nach Beginn.

Die Ergebnisse wurden mit Nummer des Pilzes in Listen aufgeschrieben und dann ausgewertet.

Untersucht wurden folgende Fakten :

1. Wachstumsstärke		(Test)		(Tabellen)
- normal und ungehemmt	=	++++	=	- + -
- leicht gehemmt	=	+++		
mittel gehemmt	=	++	=	-(+)-
stark gehemmt	=	+		
- kein Wachstum (total gehemmt)	=	-	=	-(∅)-
- Außerdem wurde noch beobachtet, ob das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle nur verzögert oder anderweitig verändert war.				

2. Form der Kolonie

- gewundene Form entsprechend der inokulierten Schlangenlinie ?
- flächenförmige Kolonie oder Rundkolonien ?
- Dicke der Kolonie, Rand oder Saum ?

3. Oberflächengestaltung

- glatt, glänzend, naß schleimig, matt ?
- rauh, körnig, gefaltet oder gefurcht ?
- Farbe ? heller oder dunkler ?

4. Textur des Pilzes (soweit möglich)

- locker bis fest ?
(Feststellbar vor allem daran, wie sich der Pilz abimpfen läßt ?)
- Verankerung mit dem Nährboden ?

Es wurden alle gesammelten Arten sowohl im Rahmen des Kaliumtellurit-Screening als auch des Acti-dione-Screening getestet.

Das Ziel dieser Untersuchungen war aber auch unter anderem, die maximale nicht total hemmende Konzentration im Rahmen der Verdünnungsreihe auszutesten. Diese Konzentrationsstufe war für die weiterführenden Untersuchungen von Bedeutung.

2.4.3.2. Nachfolgende Untersuchung auf Reisagar ohne Zusatz

Da eine Reihe von Sproßpilzen, die untersucht wurde, außer hefigen Sproßzellen noch Pseudomycel oder Chlamydosporen oder Arthrosporen bildet, ergeben sich wesentlich größere Möglichkeiten der Gestaltung und eine erhebliche

Komplizierung der Form, Struktur und Textur der Hefen. Die Wirkung von Kaliumtellurit und Acti-dione auf diese Formen kann man aber nur unter dem Mikroskop erkennen und untersuchen. Da der Reisagar sowieso für die Routinediagnostik verwendet wird, wegen seiner Durchsichtigkeit gut mikroskopierbar ist und noch dazu die Bildung der obengenannten Formen fördert, wurden die folgenden mikroskopischen Untersuchungen auf Reisagar gemacht.

Überprüft wurden jetzt nur die Hefen, die außer Sproßzellen noch weitere Formen ausbilden : *Candida albicans*, *Candida species* und *Trichosporon species*.

2.4.3.2.1. Testverfahren bei der Reisagar-Untersuchung

Vorbereitung :

Als Nährmedium wurde Reisagar ohne Zusatz wie in der Routinediagnostik verwendet. Mit dem sterilen, verflüssigten und abgekühlten Agar wurden dann dünn Petrischalen ausgegossen. Nach 1 - 2 Tagen konnte man dann mit den Untersuchungen beginnen (Näheres siehe unter 2.4.2.).

Durchführung :

Die Petrischalen wurden mit einem Farbstift in 4 Quadranten unterteilt. Nachdem die Hefen 14 Tage bis 3 Wochen lang auf Kaliumtellurit- bzw. Acti-dionenährboden gewachsen waren, wurden sie von den Schrägagarkulturen mit einer Platinöse sehr dünn in Z-Form auf den Reisagar ausgestrichen und mit Deckgläschen bedeckt. Für jede Konzentrationsstufe einschließlich der Kontrolle wurde eine eigene Reisplatte beimpft; entsprechend der Quadranten konnten auf eine Reisagarplatte je 4 Hefen der entsprechenden Reihe inoculiert werden, wodurch der Arbeitsaufwand etwas

kleiner wurde. Dadurch war auch gewährleistet, daß sich nicht nachträglich verschiedene Substanzkonzentrationen untereinander beeinflussen. Außerdem konnte man dabei auf einfache Weise mehrere Hefestämme, 4 an der Zahl, untereinander in ihren gleichen Teststufen beobachten und vergleichen. Die einzelnen Quadranten wurden in jedem Falle nach ihrer Beimpfung genau beschriftet, um keine Verwechslungen zu ermöglichen.

2.4.3.2.2. Mikroskopische Untersuchung

Mikroskopiert wurde durch die offene Petrischale hindurch, im allgemeinen mit 100-facher Vergrößerung, bei feineren Strukturen und genaueren Beobachtungen mit 1000-facher Vergrößerung (Ölimmersion). Untersucht wurde von jeder Hefe ein Abstrich von den Kontrollröhrchen als Kontrolle und je ein Abstrich von den Röhrchen jeder Konzentration, auf der Wachstum vorhanden war. Besonders untersucht wurde der Abstrich von der maximalen nicht total hemmenden Konzentration. Das war die Konzentration innerhalb der Reihe, auf der gerade noch Wachstum stattfand.

Dabei wurden die Abstriche einer Konzentrationsreihe der Reihe nach mikroskopiert, ausgewertet und miteinander verglichen, um Abhängigkeiten der Wirkung der Testsubstanzen von dem Hefestamm und der Konzentration zu untersuchen.

Es wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen mikroskopisch ausgewertet, und zwar jeweils am 1. Tag nach 24 Stunden, am 2., 3., 5., 7. und 14. Tag.

Ausgewertet wurden folgende Formen :

1. Wachstum und Blastosporen (bei allen Stämmen von *Candida albicans*, *Candida species* und *Trichosporon species*) :
 - Zeitpunkt und Menge ? Lokalisation ?
 - Sprossung in Richtung der Achse, seitlich oder vielseitig ?
 - Zellform : rund, oval, länglich ? Einzelnen oder Verband ?
 - Relative Zellgröße : klein, mittel, groß ?
 - Farbe : hell oder dunkel, in der Mitte oder am Rand der Kolonie bzw. Zelle (vor allem nach Kalium-telluritestung)
2. Pseudomycel (bei *Candida albicans* und *Candida species*) :
 - Menge : wenig, häufig, üppig ?
 - Form : dicht, verzweigt oder mit Seitenästen ?
 - Länge und Größe : kurz - mittel - lang ?
 - Einzelzelle : kurz, lang; dick oder dünn ?
 - zeitliche Verzögerungen : Auftreten früher oder später ?
3. Chlamydosporen (nur bei *Candida albicans*) :
 - Menge : wenig, zahlreicher, üppig ?
 - Form und Größe : rund, oval; klein - mittel - groß ?
 - Struktur ?
 - zeitliches Auftreten verzögert ?
4. Mycel (bei *Trichosporon*-Arten):
 - Menge : wenig - mehr ?
 - Form : dicht - vereinzelt - verzweigt ?
 - Größe und Länge : kurz - mittel - lang ?

- Septierung : wenig - stark ?
 - zeitliches Auftreten, vor allem der Septierung :
früher oder später ?
 - Einzelglieder : kurz - mittel - lang; dick - dünn ?
5. Arthrosporen (ebenfalls nur bei *Trichosporon species*) :
- zeitlicher Beginn des Zerfalls in Arthrosporen :
Verzögerungen, früher oder später ?
 - Ort des Beginns des Zerfalls in Arthrosporen :
am Anfang oder am Ende ?
 - Menge : wenig oder mehr ?
 - Form und Größe : kurz - länger; dick - dünn; rechteckig - oval ?

Genaue Angaben zu diesen Formen des Hefewachstums sind unter 2.4.1. angegeben !

Das Ziel dieser Untersuchung war besonders aufzuklären, inwieweit die beiden Testsubstanzen Acti-dione und Kaliumtellurit die Ausbildung der untersuchten Formen in Abhängigkeit von der Konzentration und der Art des Hefestammes verändern und verzögern.

2.4.4. Stärketest bei *Cryptococcus*

Manche hefeähnlichen Pilze bilden in synthetischen Nährböden einen Stoff, der sich mit Jod blau färbt und daher als stärkeähnliche Substanz bezeichnet worden ist (ASCHNER et al. (4)-). Obwohl diese "Hefestärke" offenbar nichts mit Glykogen (Pilzstärke) zu tun hat, das sich mit Jod bekanntlich rotbraun färbt, scheint trotzdem die Bezeichnung Hefestärke berechtigt zu sein, da die Jod-Stärke-Reaktion sehr kennzeichnend ist. MAGER und ASCHNER (75)

haben diesen Befund zu einer Methode ausgearbeitet, die ebenfalls bei der Bestimmung von hefeähnlichen Pilzen, vor allem zur Trennung von Cryptococcus- und Torulopsis-Arten, verwendet wird. So bilden beide Gattungen oft eine Kapsel, während aber nur alle Cryptococcus-Arten auch diese stärkeähnliche Substanz bilden.

In dieser Arbeit wurde überprüft, ob sich nach Beeinflussung der getesteten Cryptococcusstämme durch die jeweiligen Acti-dionekonzentrationen die Stärkebildung verändert oder gar ganz einstellt.

Ähnlich wie für Zuckerauxanogramme wurden mit einem Nährboden, der

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 KH_2PO_4
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
Glucose
Agar
Peptonwasser
Aqua dest.

enthält, Platten gegossen, die nach Trocknung und Festwerden mit den entsprechenden Acti-dione-beeinflußten Cryptococcus-Stämmen beimpft wurden. Beim Gießen der Platten wurden noch einige Tropfen Hefewasser (YESTOLATE; Difco Laboratories, USA) bzw. in einer anderen Versuchsreihe ein Vitamingemisch (Merck u. Co., USA) zugegeben. Die Platten blieben einige Tage im Brutschrank und wurden dann mit Lugol'scher Lösung übergossen. Je nach dem Grad der Stärkebildung trat dann eine Blaufärbung der Cryptococcus-Kolonien auf.

2.4.5. Rückimpfungsversuche

Schließlich wurde noch die Frage zu beantworten versucht, ob sich die getesteten imperfekten Hefestämme nach Aufhören der Einwirkung von Kaliumtellurit bzw. Acti-dione wieder erholen oder in ihrem Wachstum weiterhin beeinflußt bleiben. Dazu wurden von den Konzentrationsstufen, auf denen noch Wachstum stattfand (besonders aber von der maximalen nicht total hemmenden Konzentration) die getesteten Stämme wieder auf Kimmig-Agar ohne Zusatz rückgeimpft und mit den Ausgangskontrollstämmen verglichen. Das Ergebnis wurde nach 8 Tagen makroskopisch ausgewertet.

2.4.6. Physiologische Differenzierung der getesteten Hefepilze

Um die Artdiagnose der getesteten Hefepilze mit Ausnahme von *Candida albicans* stellen zu können, mußte man sich differenzierterer und langwierigerer Methoden bedienen als bei der Gattungsdiagnose. Die Mykologie kann dabei serologische oder physiologische Untersuchungsgänge anwenden (JANKE (50); RIETH und SCHÖNFELD (99)-).

Die zur Zeit noch gebräuchlichste Methode der Hefeartdiagnostik ist die Ausnutzung ihrer morphologischen und physiologischen Merkmale (LODDER und KREGER VAN RIJ (72); RIETH (96); RIETH und SCHÖNFELD (99); FISCHER (23); KALKOFF und JANKE (57); FRIEDRICH (28)-).

Vergärung :

Für LODDER und KREGER VAN RIJ ist die alkoholische Gärung das wesentliche Merkmal für die Charakteristik der Sproß-

pilze bei der Artdiagnose. Dabei werden die fermentativen Eigenschaften der Hefen bei den Zuckersorten Glucose, Galaktose, Saccharose, Maltose und Lactose untersucht (LODDER und KREGER VAN RIJ (72); STELLING-DECKER (115)-).

Bei der Ermittlung des Gärvermögens wurden hier Durham-Gärröhrchen verwendet, mit denen man die bei der Fermentation gebildeten Gasblasen ablesen kann. Von jedem Zucker wurde eine 2 %-Lösung vergoren, die außerdem noch 2 % Peptonwasser enthielt. Als Indikator wurde Bromthymolblau hergenommen, das die Lösung bei neutralem pH-Wert grün, bei saurem pH-Wert gelb und bei basischem pH-Wert blau färbt.

Herstellung der Fermentationsröhrchen :

1. Zuerst wurde eine 2 %ige Peptonlösung angesetzt :
20 g Pepton pro 1 Aqua dest.; dann filtrieren !
2. Dann wurden 4 g jeweiligen Zuckers in 200 ml Peptonwasser gelöst (2 %ige Lösung). Die Lösung kam dann 1/2 Stunde in den Dampftopf.
3. Der Lösung wurde jeweils 10 ml 0,1 % Bromthymolblaulösung zugegeben, aber sehr langsam.
Bromthymolblau : pH = 6 - 7, 6; gelb - blau (50 mg Bromthymolblau wurden in 5 ml H_2O dest. gelöst = 1 % wässrige Lösung; da nicht solubel, wurden noch 45 ml Aqua dest. hinzugefügt → 0,1 %-Lösung (Merck)-).
4. Danach wurde mit Hilfe von 1 n NaOH auf etwa pH 7 eingestellt ! Die Lösung mußte dunkelgrün werden. Dann wurde wieder 1/2 Stunde im Dampftopf sterilisiert.

5. Jetzt wurden die Reagenzgläser mit Durham-Röhrchen beschickt, deren Öffnung nach unten zeigte und ca. 5 ml Zuckerlösung in die Reagenzgläser gefüllt; pro Hefe jeweils einmal jede Zuckersorte.
6. Aus den Durham-Röhrchen wurde dann die restliche Luft entfernt, indem man die Reagenzgläser mit dem Daumen verschloß und umkippte.
7. Dann wurden die Reagenzgläser entsprechend den verschiedenen Zuckerlösungen mit farbmarkierten Stopfen verschlossen und an drei aufeinanderfolgenden Tagen im Dampftopf bei 100°C jeweils 15 Minuten sterilisiert. Jetzt waren die Fermentationsröhrchen nach Abkühlung auf etwa 40°C gebrauchsfertig !

Nun wurden die Gärlösungen in den Reagenzröhrchen mit den Hefen beimpft, pro Hefe jeweils einmal jede Lösung. Dazu wurde aus den Kulturröhrchen mit der Platinöse Hefematerial entnommen und vorsichtig mit der Gärlösung vermischt, bis die Lösung trüb erschien.

Die beimpften Röhrchen wurden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Das Ergebnis konnte nach 6 - 60 Tagen abgelesen werden. Je nach Stärke der Gasbläschenbildung wurde notiert :

Keine Gärung	= -
Schwache Gärung (ein Gasbläschen)	= +
Mäßig starke Gärung (ca. Hälfte des Röhr- chens voll Gas)	= ++
Starke Gärung (das Röhrchen schwamm oben)	= +++

Farbumschlag von
grün nach gelb = S
ohne Gasbildung bedeutet
Säurebildung !

Eine Blaufärbung der Gärlösung sprach für Verunreinigung durch alkalibildende Bakterien; in diesem Falle mußte der Versuch wiederholt werden.

Assimilation :

Die Prüfung der Assimilationsfähigkeit von Hefen wird bekanntlich in Medien durchgeführt, die keinen verwertbaren Kohlenstoff bzw. keinen verwertbaren Stickstoff enthalten. Die Fähigkeit der Zuckerassimilation vor allem eignet sich vorzüglich zu Charakterisierung von Arten, die nicht vergären wie *Cryptococcus species*, *Trichosporon species* und *Rhodotorula species*. (Bei diesen Hefen wurde nur die Assimilation geprüft, bei den *Candida*- und *Torulopsis*-Arten wurde sowohl die Gär- wie auch die Assimilationsprobe gemacht). Zur Assimilationsprüfung sind zwei Methoden gebräuchlich, der von WICKERHAM (133) ausgearbeitete Wuchstest im flüssigen Medium und die hier angewandte auxanographische Methode, wie sie von DIDDENS und LODDER (18) beschrieben worden ist. Da in dieser Arbeit nur medizinisch wichtige Sproßpilze untersucht wurden, genügte voll und ganz die auxanographische Methode, die überdies den Vorteil hat, daß sie bereits nach 24 oder 48 Stunden abgelesen werden kann.

Es mußte die Kohlenstoff- und die Stickstoffassimilation untersucht werden. Als Kohlenstoffquelle dienten auch hier die fünf Zucker Glucose, Galaktose, Saccharose, Maltose und Lactose. Bei der Stickstoffverwertung war von Bedeutung, ob Stickstoff in anorganischer Form als KNO_3

assimiliert werden kann. Zur Kontrolle wurde die Assimilation von organischem Stickstoff in Pepton, die allen Hefen möglich ist, mitgeprüft.

C-Assimilation :

Die meisten Hefen unterscheiden sich in der Zuckerverwertung voneinander. Um entscheiden zu können, welcher Zucker assimiliert wird, muß ein kohlehydratfreies Medium hergestellt werden, dem dann der zu prüfende Zucker zugegeben wird.

Reagenzien : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,0
KH_2PO_4	1,0
Mg SO_4	0,5
Agar (gereinigt und pulverisiert !)	18,0
Agua destillata ad	1000,0

S. Dann 3 x 30 Minuten im Dampftopf sterilisieren ! In kleine 250 ml Kolben abfüllen und nochmals kurz sterilisieren !

Verwendet wurde statt des früher allgemein gebräuchlichen und in der Herstellung komplizierten Faulagars der Spezial-Agar Noble von Difco-Laboratories (POLEMANN (93); BÜHLMANN (10) u.a.). Mit diesem Agar ist die Methode einfacher geworden und im Ergebnis gleich gut geblieben.

Plättchenherstellung :

1. Dünne, runde, kleine Filterpapierplättchen wurden in 5 Glasgefäßen (Anzahl der Zucker !) bei ca. 100°C eine Stunde sterilisiert.

2. Von den einzelnen Zuckerarten Dextrose, Galaktose, Saccharose, Maltose und Lactose wurde je eine 20 %ige sterile Lösung hergestellt (durch fraktionierte Sterilisation im Dampftopf).
3. Dann wurden die einzelnen Zuckerlösungen auf die Plättchen in den sterilen Glasgefäßen gegeben.

Arbeitsgang :

- In einem Reagenzglas wurde mit etwa 5 ml physiologischer Kochsalzlösung eine trübe Sporensuspension von jeder Hefe zubereitet (milchiges Aussehen).
- In eine Petrischale wurden dann ca. 2 - 3 ml Suspension gegeben (der Rest blieb für die Stickstoffassimilation).
- Und dann sofort ca. 20 ml des abgekühlten Zuckerassimilationsagar darüber geschüttet. Durch vorsichtiges Schwenken wurden Hefe und Agar vermischt.
- Die Petrischalen ließ man 2 - 4 Stunden mit dem Deckel nach unten bei Zimmertemperatur trocknen. Dann wurden an markierten Stellen die in den verschiedenen Zuckerlösungen getränkten und abgetropften Plättchen (je Hefe alle Zuckersorten) mit der sterilen Pinzette aufgelegt.
- Die Schalen wurden mit dem Deckel nach unten stehen gelassen.

Nach ca. 2 Tagen wurden die Ergebnisse abgelesen : Die Platten wurden im durchfallenden Licht gegen einen dunklen Hintergrund betrachtet. War ein Zucker assimiliert worden, so befand sich um das entsprechende Plättchen ein Trübungshof (Wuchszone).

Nitratassimilation :

LODDER und KREGER VAN RIJ betrachten die Nitratassimilation als einen wichtigen Grund zur Abtrennung einer Art. Während alle Hefen in der Lage sind, organischen Stickstoff zu assimilieren, sind die im medizinischen Untersuchungsmaterial häufigen Sproßpilzarten meist nicht in der Lage, das anorganische KNO_3 zu verwerten. Dieses Merkmal hat deshalb nur für die Stämme der Gattung *Trichosporon*, *Cryptococcus* und *Rhodotorula* sowie für einige *Candida*- und *Torulopsis*-Arten Bedeutung.

Für diese Prüfung wurde ein stickstoffreies Basalmedium hergestellt, zu dem dann wahlweise organischer Stickstoff in Form von Pepton und anorganischer Stickstoff in Form von Kaliumnitrat gegeben wurde.

Agar :	Glucose	20,0
	KH_2PO_4	1,0
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5
	Ebenfalls	
	Difco Special Agar Noble	18,0
	Aqua dest. ad	1000,0

S. wie Zuckerassimilationsbasalmedium.

Die Methodik ist dieselbe wie bei der Zuckerverwertung. Auch hier wurden Petrischalen ausgegossen, die dann mit 2 Plättchen belegt wurden. Das eine war nach Anfeuchten mit dem Nährboden vorher in KNO_3 , das andere in Pepton getaucht worden. Es wurden vorher sterilisierte Plättchen verwendet.

Nach ungefähr 1 - 2 Tagen konnte man dann ablesen, ob je nach Hefe um die Plättchen Trübungshöfe gebildet waren.

Um das Kontrollplättchen mit Pepton war immer Wachstum vorhanden.

Identifiziert wurden dann die Hefen anhand der vorliegenden Ergebnisse nach dem Bestimmungsschlüssel für imperfekte Hefen von RIETH und SCHÖNFELD (99).

3. U N T E R S U C H U N G S E R G E B N I S S E

3.1. ERGEBNISSE DER IDENTIFIZIERUNG

Da es für das Verständnis der im folgenden besprochenen Ergebnisse notwendig ist, seien als erstes die Resultate der Artdifferenzierung angeführt.

Von den 90 Candida-Stämmen gehörten 52 Stämme zur Art *Candida albicans*, die damit der häufigste Pilz war, wie Tabelle 3 zeigt.

Tabelle 3 : Übersicht über die Verteilung der Candida-Arten

Anzahl der Candida Stämme	90
Ergebnis der Identifizierung :	
<i>Candida albicans</i>	52
<i>Candida parapsilosis</i>	19
<i>Candida tropicalis</i>	9
<i>Candida guilliermondii</i>	4
<i>Candida pseudotropicalis</i>	3
<i>Candida krusei</i>	2
<i>Candida lipolytica</i>	1

Die 38 Stämme der Gattung *Torulopsis* verteilten sich nach Tabelle 4 wie folgt :

Tabelle 4 : Übersicht über die Verteilung der *Torulopsis*-Arten

Anzahl der <i>Torulopsis</i> -Stämme :	38
Ergebnis der Identifizierung :	
<i>Torulopsis</i> famata	13
<i>Torulopsis</i> sake	7
<i>Torulopsis</i> dattila	5
<i>Torulopsis</i> candida	4
<i>Torulopsis</i> glabrata	4
<i>Torulopsis</i> inconspicua	1
<i>Torulopsis</i> gropengiesseri	1
<i>Torulopsis</i> stellata	1
<i>Torulopsis</i> utilis	1

Die *Trichosporon*-Arten waren unter den 20 getesteten Stämmen laut Tabelle 5 folgendermaßen vertreten :

Tabelle 5 : Übersicht über die Verteilung der *Trichosporon*-Arten

Anzahl der <i>Trichosporon</i> -Stämme	20
Ergebnis der Identifizierung :	
<i>Trichosporon</i> cutaneum	11
<i>Trichosporon</i> capitatum	6
<i>Trichosporon</i> pullulans	2
<i>Trichosporon</i> fermentans	1

Die Gattung *Cryptococcus* war unter den 6 untersuchten Stämmen nur mit ihrem Hauptvertreter *Cryptococcus neoformans* vertreten.

Die 33 Stämme der Gattung *Rhodotorula* verteilten sich nach Tabelle 6 wie folgt :

Tabelle 6 : Übersicht über die Verteilung der *Rhodotorula*-Arten

Anzahl der <i>Rhodotorula</i> -Stämme :	33
Ergebnis der Identifizierung :	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	21
<i>Rhodotorula rubra</i>	7
<i>Rhodotorula glutinis</i>	3
<i>Rhodotorula pallida</i>	1
<i>Rhodotorula minuta</i>	1

Der Einfluß der Testsubstanzen auf die untersuchten imperfekten Hefen :

3.2. EMPFINDLICHKEITSTESTUNG VON KALIUMTELLURIT

3.2.1. Makroskopische Untersuchungsergebnisse :

3.2.1.1. *Candida species* :

Alle isolierten Hefen wurden in 5 Konzentrationsstufen von 50 - 2000 µg/ml (0,005 - 0,2 %) Kaliumtellurit im Nährboden geprüft. Die Ergebnisse sind zusammenfassend aus Tabelle 7 zu ersehen. Die Konzentration für die totale Hemmung lag bei den *Candida*-Arten zwischen 1000 µg/ml und 2000 µg/ml (0,1 % und 0,2 %). Aus der Tabelle 7 ist

weiter ersichtlich, daß praktisch alle *Candida*-Arten einer Beeinflussung durch Kaliumtellurit unterliegen. Ferner ist auch ablesbar, daß die Wachstumsbeeinflussung mit steigender Kaliumtelluritkonzentration im Nährboden zunahm.

Candida albicans :

Im Vergleich mit der Kontrolle lag die maximale nicht total hemmende Konzentration für die überwiegende Mehrheit bei 1000 µg/ml (0,1 %); nur für 2 Ausnahmen war auch bei 2000 µg/ml (0,2 %) Kaliumtellurit noch ein sehr geringes Wachstum festzustellen. Es ist aber hinzuzufügen, daß auch bei 1000 µg/ml (0,1 %) das Wachstum nur noch sehr gering, die Hemmung also fast total, bei 3 Stämmen sogar total war. Bei dieser Konzentration war von Anfang der Ablesung an das Wachstum sehr stark gehemmt; das Aussehen der Kolonie war schmutzig-grau, die Oberfläche naß-schmierig. Dagegen war bei der im Routinebetrieb verwendeten Konzentration von 300 µg/ml (0,03 %) das Wachstum in 48 Fällen nur leicht gehemmt; in 4 Fällen zeigte sich makroskopisch keine Beeinflussung der Wachstumsstärke. Dabei war auffallend, daß es auch bei dieser Konzentrationsstufe zunächst nach einer stärkeren bis mittleren Wachstumshemmung in den ersten Tagen der Ablesung aussah; aber bereits nach 7 Tagen konnte man erkennen, daß das Wachstum nur relativ wenig beeinflusst wurde. Die Farbe der Sproßpilze war dunkelgrau, die Oberfläche kaum verändert. Geringer war die Wachstumsverzögerung bei der nächst niedrigeren Konzentration von 100 µg/ml (0,01 %). Hier war das Wachstum nach wenigen Tagen, wenn überhaupt, noch leicht gehemmt, fast gleich stark wie auf dem Kontrollröhrchen. Die Farbe der Kolonie

war meist mittelgrau, die Oberfläche von der Kontrolle nur durch den Farbton zu unterscheiden. Normales Wachstum ohne Verzögerung zeigten alle *Candida albicans*-Stämme bei der niedrigsten Konzentrationsstufe von 50 µg/ml (0,005 %). Hier blieb der von Anfang an hell- bis mittelgraue Farbton der auf Kaliumtellurit gewachsenen Stämme der einzige Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

Interessant bei dieser Konzentrationsstufe war ein auffallend hellgrauer, glasig-durchsichtiger Randsaum der Kolonien, dessen Übergang nicht allmählich, kontinuierlich, sondern abrupt war. Dieser Randsaum war in der nächsten Konzentrationsstufe von 100 µg/ml (0,01 %) schwächer ausgebildet und in der Konzentrationsstufe von 300 µg/ml (0,03 %) schon fast gar nicht mehr zu sehen.

Im Gegensatz zur Wachstumsstärke, die mit Zunahme des Kaliumtelluritgehaltes im Nährboden abnahm, wurde die Farbe der Kolonien intensiver, dunkelgrauer, schwärzer, schmutziger aussehend, da die Pilze mehr Tellurit reduzierten. Ebenso wurde auch der nicht bewachsene Nährboden allgemein mit zunehmender Konzentration dunkler gefärbt, während die Farbe des Nährbodens vor Beimpfung mit den Sproßpilzen in allen Stufen fast gleich war und vom Kimmig-Agar ohne Zusatz nicht zu unterscheiden war. Die Form der Kolonien sowie die Textur der Pilze wurden durch Kaliumtellurit nicht verändert.

Auch ergab sich kein Unterschied in den Testergebnissen, ob man bei der Herstellung der Kaliumtelluritreihe den Kimmig-Agar mit 1 %-Kaliumtelluritlösung relativ stark verdünnt hatte oder mit 2 %-Kaliumtelluritlösung weniger

stark verwässern mußte. Vorweggenommen zeigten auch alle übrigen untersuchten Hefegattungen dadurch keine Änderung der Untersuchungsergebnisse.

Candida species (ohne Candida albicans) :

Obwohl das bei *Candida albicans* Beschriebene auch weitgehend hier gilt und nicht wiederholt wird, fällt doch auf, daß die Hemmung des Wachstums bei den übrigen *Candida*-Arten früher einsetzte, nämlich bereits bei der niedrigen Konzentration von 100 µg/ml (0,01 %) und mit steigender Konzentration in den meisten Fällen ausgeprägter als bei *Candida albicans* war. Bis auf Ausnahmen lag auch hier die maximale nicht total hemmende Konzentration bei 1000 µg/ml (0,1 %), wo aber das Wachstum bereits ebenfalls sehr stark bis fast total gehemmt wurde (vergl. Abb. 1).

Während 8 Stämme bei 100 µg/ml (0,1 %) bereits total gehemmt waren, zeigten dagegen 7 andere Stämme auch bei 2000 µg/ml (0,2 %) Kaliumtellurit noch ein sehr geringes Wachstum. Bei der im mykologischen Labor verwendeten Konzentration von 300 µg/ml (0,03 %) zeigte sich in keinem Falle eine totale oder fast totale Hemmung, wenngleich die Hemmung bzw. Wachstumsverzögerung in vielen Fällen stärker als bei *Candida albicans* war. Bei 100 µg/ml (0,01 %) Kaliumtellurit zeigten alle untersuchten Stämme bereits eine mehr oder weniger ausgeprägte Hemmung und Wachstumsverzögerung und erwiesen sich dadurch gegenüber Kaliumtellurit im Vergleich zu *Candida albicans* als mehr empfindlich. Bei 50 µg/ml (0,005 %) war auch hier das Wachstum von der Kontrolle nur durch die dunklere Tellurfärbung zu unterscheiden.

Tabelle 7 : Wirkung von Kaliumtellurit auf das Wachstum der Candida-Arten
(Ablesung nach 2 Wochen)

Bezeichnung der getesteten Stämme	Anzahl der getesteten Stämme	Anzahl der Stämme, die kein Wachstum -Ø-, mehr oder weniger ge- hemmtes Wachstum -(+)- oder volles Wachstum - + - zeigten. Kaliumtelluritkonzentrationen in µg/ml und % angegeben.						
		2000	1000	300	100	50	µg/ml	
		0,2	0,1	0,03	0,01	0,005	Vol. %	
		Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +		
Candida albicans	52	50 2 -	3 49 -	- 48 4	- - 52	- - 52		
Candida parapsi- losis	19	14 5 -	5 12 2	- 17 2	- 17 2	- - 19		
Candida tropica- lis	9	9 - -	1 8 -	- 9 -	- 9 -	- - 9		
Candida guillier- mondii	4	4 - -	- 4 -	- 4 -	- 4 -	- - 4		
Candida pseudo- tropica- lis	3	1 2 -	- 3 -	- 3 -	- 2 1	- - 3		
Candida krusei	2	2 - -	2 - -	- 2 -	- 2 -	- - 2		
Candida lipoly- tica	1	1 - -	- 1 -	- 1 -	- 1 -	- - 1		
Gesamtzahlen	90	81 9 -	11 77 2	- 84 6	- 35 55	- - 90		



Abb. 1 : Beeinflussung des Wachstums von *Candida species* (hier *Candida parapsilosis*) durch Kaliumtellurit auf Kimmig-Agar :

- a) Ablesung nach 10 Tagen von links nach rechts :
ohne Zusatz, dann 50; 100; 300 und 1000 $\mu\text{g/ml}$ (0,005; 0,01; 0,03; und 0,1 %) Kaliumtellurit im Nährboden. Beachte die mit steigendem Kaliumtelluritgehalt zunehmende Verfärbung der Kolonie, den hellen Randsaum vor allem bei 50 $\mu\text{g/ml}$ (0,005 %) und die fast totale Hemmung bei 1000 $\mu\text{g/ml}$ (0,1 %), während in diesem Falle bei 300 $\mu\text{g/ml}$ (0,03 %) nur eine leichte Hemmung war.
- b) *Candida species* (hier *Candida parapsilosis*) auf Kimmig-Agar mit 50 $\mu\text{g/ml}$ (0,005 %) Kaliumtelluritzusatz. Alter der Kolonie 7 Tage. Beachte den deutlich sichtbaren Randsaum!

Bei einem Vergleich der einzelnen Arten fiel auf, daß *Candida lipolytica*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* gegenüber Kaliumtellurit empfindlicher als *Candida parapsilosis* und *Candida pseudotropicalis* waren. Bei *Candida parapsilosis* ergab sich ferner auch eine deutliche Uneinheitlichkeit im Verhalten innerhalb einer Art. Während bei 1000 µg/ml (0,1 %) Kaliumtellurit 2 Stämme unbeeinflusst blieben, zeigten 5 Stämme bereits hier kein Wachstum mehr; dagegen zeigten 5 andere Stämme auch noch bei 2000 µg/ml (0,2 %) geringes Wachstum.

3.2.1.2. Torulopsis species

Da *Torulopsis species* allein in Form von Blastosporen wächst, wurde diese Art nur makroskopisch auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Kaliumtellurit getestet. Die maximale nicht total hemmende Konzentration war bei den einzelnen Arten und Stämmen sehr unterschiedlich und bewegte sich zwischen 300 µg/ml (0,03 %) und 2000 µg/ml (0,2 %) Kaliumtellurit im Nährboden. Von Ausnahmen abgesehen, kann man feststellen, daß sich diese Gattung als relativ widerstandsfähig gegenüber Kaliumtellurit erwiesen hat. Ferner ist für die mykologische Laboratoriumspraxis wichtig, daß bei der Routinekonzentration von 300 µg/ml (0,03 %) kein Stamm total, sondern das Wachstum nur leicht bis mittel gehemmt wurde. Siehe dazu Tabelle 8 !

Tabelle 8 : Wirkung von Kaliumtellurit auf das Wachstum der *Torulopsis*-Arten.
(Ablesung über insgesamt 2 Wochen)

Bezeichnung der getesteten Stämme	Anzahl der getesteten Stämme	Anzahl der Stämme, die kein Wachstum -Ø-, mehr oder weniger gehemmtes Wachstum -(+)- oder volles Wachstum - + - zeigten. Kaliumtelluritkonzentrationen in µg/ml und % angegeben.					
		2000	1000	300	100	50 µg/ml	
		0,2	0,1	0,03	0,01	0,005 Vol. %	
		Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	
<i>Torulopsis famata</i>	13	12 1 -	4 9 -	- 12 1	- 2 11	- - 13	
<i>Torulopsis sake</i>	7	3 4 -	- 7 -	- 6 1	- - 7	- - 7	
<i>Torulopsis dattila</i>	5	3 2 -	1 4 -	- 5 -	- 5 -	- - 5	
<i>Torulopsis glabrata</i>	4	3 1 -	2 2 -	- 4 -	- 3 1	- - 4	
<i>Torulopsis candida</i>	4	3 1 -	1 3 -	- 1 3	- - 4	- - 4	
<i>Torulopsis utilis</i>	2	- 2 -	- 2 -	- 2 -	- - 2	- - 2	
<i>Torulopsis inconspicua</i>	1	- 1 -	- 1 -	- 1 -	- - 1	- - 1	
<i>Torulopsis gropengiesseri</i>	1	1 - -	- 1 -	- 1 -	- - 1	- - 1	
<i>Torulopsis stellata</i>	1	1 - -	- 1 -	- 1 -	- 1 -	- - 1	
Gesamtzahlen	38	26 12 -	8 30 -	- 33 5	- 11 27	- - 38	

Betrachtet man die Gattung insgesamt, so wich bei der niedrigsten Konzentration von 50 µg/ml (0,005 %) die Wachstumsstärke von der Kontrolle nicht ab. Auch bei der nächst höheren Konzentration von 100 µg/ml (0,01 %) zeigten erst 11 Stämme eine leichte Wachstumshehmung. Bei 300 µg/ml (0,03 %) war die Wachstumshehmung bzw. Verzögerung leicht bis mittelstark. Erst bei 1000 µg/ml (0,1 %) waren 18 Stämme vollständig gehemmt, während der Großteil der 38 Stämme hier noch mittel bis stark gehemmtes Wachstum zeigte. Bei 2000 µg/ml (0,2 %) war der größte Teil total im Wachstum gehemmt, aber 12 Stämme zeigten auch hier noch mittel bis sehr stark gehemmtes Wachstum. Bei allen Stämmen war anfänglich auch eine Wachstumsverzögerung von 3 - 4 Tagen zu beobachten. Die Farbe der Kolonien nahm mit steigender Kaliumtelluritkonzentration im Nährboden von dunkelgrau bis braun-schwarz bei den hohen Konzentrationen zu, ebenso wurde auch der übrige, nicht bewachsene Nährboden dunkler gefärbt. Auffallend bei dieser Gattung war, daß der bereits bei den Candida-Arten vor allem in den niedrigen Konzentrationen beobachtete helle Randsaum der Kultur, unabhängig von der Art, nur bei 23 Stämmen (nicht ganz 2/3 der Stämme) festzustellen war. Auch hier verlor sich dieser Saum mit steigender Konzentration.

Merkwürdig bei 13 Stämmen dieser Gattung war eine besondere Formentwicklung der Kolonie auf Kaliumtellurit. Während des Verlaufs der inokulierten Schlangenlinie war das Wachstum in der oberen Hälfte nicht mehr kontinuierlich, sondern es bildeten sich lauter kleine, schwarze hintereinanderliegende Rundkolonien, so daß sich das Bild einer dunklen, gewundenen, zarten Perlenkette in der

Schrägagarkultur ergab; dieses Phänomen war am stärksten bei 100 µg/ml (0,01 %), schwächer bei 50 µg/ml (0,005 %) ausgebildet. Bei 300 µg/ml (0,03 %) Kaliumtellurit verschmierten sich diese kleinen Rundkolonien wieder, da bei den höheren Konzentrationen allgemein die Oberfläche der Kultur braunschwarz-schmierig wurde. Diese "Perlung" war vor allem bei *Torulopsis dattila* und *Torulopsis glabrata*, aber auch bei je 2 Stämmen von *Torulopsis sake*, *Torulopsis famata*, *Torulopsis candida* und ferner auch bei *Torulopsis inconspicua* zu sehen.

Bei einem Vergleich der Arten dieser Gattung fällt auf, daß besonders *Torulopsis sake*, aber auch *Torulopsis dattila*, weniger empfindlich zu sein scheinen als *Torulopsis glabrata*, *Torulopsis candida* oder vor allem *Torulopsis famata*, wie aus Tabelle 8 deutlich zu erkennen ist. Die gleiche Tabelle zeigt auch, daß die Stärke der Wachstumshemmung von der Höhe der Kaliumtelluritkonzentration im Nährboden abhing.

3.2.1.3. Trichosporon species

Bei der makroskopischen Untersuchung auf Kimmig-Agar erwies sich diese Gattung als sehr empfindlich gegenüber Kaliumtellurit, wie Tabelle 9 beweist. Die maximale nicht total hemmende Konzentration lag bis auf eine einzige Ausnahme bei 300 µg/ml (0,03 %) Kaliumtellurit im Nährboden; bei 1000 µg/ml (0,1 %) zeigte nur noch 1 Stamm der Art *Trichosporon cutaneum* sehr geringes Wachstum. Bei der im Labor verwendeten Routinekonzentration von 300 µg/ml (0,03 %) (hier zugleich maximale nicht total hemmende Konzentration !) war das Wachstum unabhängig von der Art leicht bis mittel gehemmt, anfänglich gering ver-

zögert, jedoch nie fast total gehemmt. Nur *Trichosporon fermentans* zeigte hier eine starke Hemmung. Bei 100 µg/ml (0,01 %) zeigten 11 Stämme eine leichte Wachstums hemmung, während die übrigen Stämme anfänglich nur leicht im Wachstum verzögert, nach 14 Tagen Beobachtung im Wachstum jedoch nicht mehr beeinflusst waren. Bei 50 µg/ml (0,005 %) Kaliumtellurit ergab sich keine Beeinflussung der Wachstumsstärke.

Wie die Wachstumsbeeinflussung so nahm auch die Färbung durch das abgelagerte reduzierte Tellurit mit steigender Konzentration zu, von hellgrau über mittelgrau bis dunkelgrau. Kein Stamm zeigte aber eine intensive Schwärzung der Kultur. Auch der bei den übrigen imperfekten Hefen beobachtete Randsaum fehlte gänzlich.

Dagegen waren hier, was die Oberfläche betrifft, sehr starke makroskopische Veränderungen zu beobachten : Die auf der Kontrolle stark gewundenen, vorgewölbten und mehr oder weniger zerklüfteten Oberflächen (*Trichosporon cutaneum* wächst allgemein sehr zerklüftet, *Trichosporon capitatum* und *pullulans* weniger grob, *Trichosporon fermentans* fein zerklüftet) erschienen in Abhängigkeit von der Kaliumtelluritkonzentration zunehmend flacher, glatter und weniger gewunden. Ein Teil (7 Stämme) zeigte bei 300 µg/ml (0,03 %) überhaupt keine "gebirgig" wirkende Zerklüftung mehr; hier wirkte die Oberfläche nur noch samtig-feucht. Eine interessante Ausnahme bildete gerade der Stamm (*Trichosporon capitatum*), der auch bei 1000 µg/ml (0,1 %) noch Wachstum zeigte. Seine Oberfläche wirkte mit steigender Konzentration faltiger, gewundener und zerklüfteter.

Tabelle 9 : Wirkung von Kaliumtellurit auf das Wachstum der Trichosporon-Arten
und Cryptococcus neoformans (Ablesung über 2 Wochen)

Bezeichnung der getesteten Stämme	Anzahl der getesteten Stämme	Anzahl der Stämme, die kein Wachstum -Ø-, mehr oder weniger gehemmtes Wachstum -(+)- oder volles Wachstum - + - zeigten. Kaliumtelluritkonzentrationen in µg/ml und. % an- gegeben					
		2000	1000	300	100	50 µg/ml	
		0,2	0,1	0,03	0,01	0,005 Vol. %	
		Ø (+) -	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	
Trichosporon cutaneum	11	11 - -	10 1 -	- 11 -	- 7 4	- - 11	
Trichosporon capitatum	6	6 - -	6 - -	- 6 -	- 3 3	- - 6	
Trichosporon pullulans	2	2 - -	2 - -	- 2 -	- - 2	- - 2	
Trichosporon fermentans	1	1 - -	1 - -	- 1 -	- 1 -	- - 1	
Trichosporon species gesamt	20	20 - -	19 1 -	- 20 -	- 11 9	- - 20	
Cryptococcus neoformans	6	6 - -	4 2 -	- 4 2	- 1 5	- - 6	

Kaliumtellurit veränderte bei *Trichosporon* species auch die Textur der Pilze. Während der auf der Kontrolle fest wirkende Pilz sich nur mühevoll abimpfen ließ, konnte der auf Kaliumtellurit gewachsene, schleimig wirkende Pilz relativ leicht von den Kimmig-Agarnährböden für die nachfolgende Untersuchung auf Reisagar überimpft werden.

3.2.1.4. Cryptococcus species

Die einzige Art der Gattung *Cryptococcus*, die hier getestet wurde, war *Cryptococcus neoformans*. Die 6 Stämme wurden nur makroskopisch untersucht. Wie Tabelle 9 zeigt, war die maximale nicht total hemmende Konzentration entweder 1000 µg/ml (0,1 %) oder 300 µg/ml (0,03 %) Kaliumtellurit im Nährboden. Während 4 Stämme bei 1000 µg/ml (0,1 %) schon total gehemmt waren, zeigten 2 Stämme hier noch geringes Wachstum. Bei der Routinekonzentration von 300 µg/ml (0,03 %) war die Hemmung für 4 Stämme leicht bis mittel; 2 Stämme wuchsen im Vergleich zur Kontrolle während des Beobachtungszeitraumes nach anfänglicher Verzögerung unverändert stark. Auch hier war kein Stamm stark oder fast total gehemmt. Bei 100 µg/ml (0,01 %) wurde nur 1 Stamm leicht gehemmt, während bei 50 µg/ml (0,005 %) alle *Cryptococcus neoformans*-Stämme unbehindertes Wachstum aufwiesen.

Auch bei dieser Art nahm die Verfärbung durch reduziertes Tellurit mit steigender Konzentration zu, doch kam es zu keiner sehr dunklen Pigmentierung. Selbst bei der maximalen nicht total hemmenden Konzentration war die Verfärbung der Oberfläche nur hell- bis mittelgrau und erinnerte an den Farbton von Blei. Dagegen war auch hier

bei 50 µg/ml (0,005 %) ein deutlich heller, grauweißlicher Randsaum ausgeprägt, der bei 100 µg/ml (0,01 %) schwächer und bei 300 µg/ml (0,03 %) überhaupt nicht mehr in Erscheinung trat. Mit steigender Konzentration wirkten die Stämme schleimiger, schmieriger; eine Veränderung der Form der Kolonie oder der Textur des Pilzes trat nicht auf.

3.2.1.5. Rhodotorula species

Rhodotorula species wurde nur makroskopisch untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 10 zusammengefaßt und zeigt wieder, daß die Wachstumsbeeinflussung von der Kaliumtelluritkonzentration im Nährboden abhängig war. Die maximale nicht total hemmende Konzentration bewegte sich bei dieser Gattung je nach Art und Stamm zwischen 300 µg/ml (0,03 %) und 2000 µg/ml (0,2 %) Kaliumtellurit im Nährboden. Diese Gattung erwies sich bei den Untersuchungen als auffallend widerstandsfähig gegenüber Kaliumtellurit, da bei 2000 µg/ml (0,2 %) noch genau die Hälfte der Stämme ein geringes, wenn auch mittel bis stark gehemmtes Wachstum zeigte. Bei 1000 µg/ml (0,1 %) waren nur 7 Stämme total gehemmt; die Mehrzahl wuchs hier leicht bis stark gehemmt. Bei der in der mykologischen Praxis verwendeten Konzentration von 300 µg/ml (0,03 %) waren dagegen 19 Stämme im Vergleich zur Kontrolle ungehemmt, wenn auch am Anfang mit geringer Verzögerung wachsend. Kein Stamm wurde hier total, nur 1 Stamm stark gehemmt. Bei 100 µg/ml (0,01 %) zeigten nur 7 Stämme eine leichte Wachstumshe-mung, bei 50 µg/ml (0,005 %) wuchs jeder Stamm im Vergleich zur Kontrolle unverändert stark.

Tabelle 10 : Wirkung von Kaliumtellurit auf das Wachstum der Rhodotorula-Arten
(Ablesung über 2 Wochen)

Bezeichnung der getesteten Stämme	Anzahl der ge- testeten Stämme	Anzahl der Stämme, die kein Wachstum -Ø-, mehr oder weniger gehemmtes Wachstum -(+)- oder volles Wachstum - + - zeigten. Kaliumtelluritkonzentrationen in µg/ml und % angegeben					
		2000	1000	300	100	50 µg / ml	
		0,2	0,1	0,03	0,01	0,005 Vol. %	
		Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +
Rhodotorula mucilaginosa	21	10 11 -	2 19 -	- 8 13	- 2 19	- -	21
Rhodotorula rubra	7	2 5 -	- 7 -	- 1 6	- 1 6	- -	7
Rhodotorula glutinis	3	3 - -	3 - -	- 3 -	- 3 -	- -	3
Rhodotorula minuta	1	1 - -	1 - -	- 1 -	- 1 -	- -	1
Rhodotorula pallida	1	1 - -	1 - -	- 1 -	- - 1	- -	1
Gesamtzahlen	33	17 16 -	7 26 -	- 14 19	- 7 26	- -	33

Die ebenfalls mit steigender Kaliumtelluritkonzentration zunehmende Verfärbung der Kolonien durch reduziertes Tellurit war bei dieser Gattung sehr intensiv. Die Farbe nahm von graurot, mittelbraun bis zu einem kräftigen braunschwarzen bzw. schmutzig-schwarzen Farbton zu; ebenso wurde auch der nicht beimpfte Teil des Nährboden zunehmend dunkler verfärbt. Bereits bei der Routinekonzentration von 300 µg/ml (0,03 %) war der rote Farbton durch reduziertes Tellurit gänzlich überdeckt, so daß ab dieser Stufe die Testpilze nicht mehr als rote Hefen erkannt werden konnten.

Bis auf 2 Ausnahmen der Art *Rhodotorula glutinis* kam es bei allen Stämmen auch wieder zu einer deutlichen Ausbildung eines glasig-hellroten oder hellgrauen Randsaumes, vor allem bei der auf 50 µg/ml (0,005 %) gewachsenen Testreihe. Vereinzelt war dieser Randsaum auch noch schwach bei 300 µg/ml (0,03 %) zu erkennen, verschwand aber dann gänzlich.

Zu einer Veränderung der Form der Kolonien oder der Textur der Pilze kam es nicht.

Betrachtet man die einzelnen Arten getrennt, so fällt auf, daß *Rhodotorula rubra* und *Rhodotorula mucilaginosa* von den untersuchten roten Hefen am wenigsten empfindlich gegenüber Kaliumtellurit waren. Von diesen Arten war selbst bei 2000 µg/ml (0,2 %) der Großteil der Stämme noch nicht ganz im Wachstum gehemmt; bei 1000 µg/ml (0,1 %) zeigten sogar nur 2 Stämme von *Rhodotorula mucilaginosa* totale Hemmung. *Rhodotorula glutinis* und *Rhodotorula pallida* sowie *Rhodotorula minuta* erwiesen sich als weniger widerstandsfähig gegenüber Kaliumtellurit,

da diese Stämme sämtlich bereits bei 1000 µg/ml (0,1 %) total im Wachstum gehemmt wurden.

3.2.1.6. Ergebnisse der Rückimpfungsversuche

Candida albicans :

Nach Rückimpfung von der maximalen nicht total hemmenden Konzentration, bei der die Wachstumshemmung sehr stark war, erholten sich die Stämme von Tag zu Tag zusehends und zeigten im Vergleich zur Kontrolle ein zwar mehr cremiges, flächig verschmiertes, aber doch nur noch leicht bis mittel gehemmtes Wachstum. Bei den niedrigeren Konzentrationsstufen zeigte sich mit abnehmender Kaliumtelluritkonzentration eine zunehmende Erholung.

Candida species (ohne Candida albicans) :

Hier blieb nach der Rückimpfung von der maximalen nicht total hemmenden Konzentration auf Kimmig-Agar ohne Zusatz eine starke Hemmung erhalten. Mit Abnahme der Hemmstoffkonzentration kam es zwar zu einer ausgeprägteren Erholung, doch blieb eine Beeinflussung der Wachstumsstärke bis zur niedrigsten Konzentration erhalten.

Torulopsis species :

Bei dieser Gattung blieben die Wachstumshemmungen in quantitativer Abhängigkeit von der vorherigen Kaliumtelluritkonzentration erhalten.

Trichosporon species :

Hier war im Vergleich zur Kontrolle eine geringe Zunahme des Wachstums der Stämme zu beobachten, die bei *Trichosporon capitatum* am deutlichsten war.

Cryptococcus neoformans :

Bei diesen Stämmen war keine Wachstumserholung zu erkennen.

Rhodotorula species :

Auch bei dieser Gattung blieb die Wachstumshemmung durch Kaliumtellurit erhalten. Bei den niedrigen Konzentrationen wurde die Pigmentierung aber im Vergleich zur Kontrolle wieder dunkler und kräftiger.

Für alle im Rahmen der Kaliumtellurit-Testung untersuchten Pilze ergab sich, daß auch bei Subkultur auf das telluritfreie Nährmedium eine graue bis schwarze Pigmentierung durch reduziertes Tellur erhalten blieb. Allerdings waren die Pigmentierungen der Subkulturen schwächer als die der Versuchsreihe.

3.2.2. Mikroskopische Untersuchungsergebnisse

Im Anschluß an diese Untersuchungen wurden die Candida- sowie die Trichosporon-Stämme auch mikroskopisch untersucht, da sie neben Blastosporen noch weitere, typische Wuchsformen bildeten, deren Veränderungen bzw. Schädigungen durch Kaliumtellurit aber nur unter dem Mikroskop zu erfassen waren. Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgten nach Abimpfung von den kaliumtellurithaltigen Kimmig-Agarnährböden auf Reis-Agar ohne Zusatz, auf dem sich die speziellen mykologischen Merkmale ausbilden können.

3.2.2.1. Candida albicans

Nach der maximalen nicht total hemmenden Konzentration kam es zu einer verschieden starken Beeinflussung durch

Kaliumtellurit. Während 15 Stämme keine Bildung von Pseudomycel und Chlamydosporen mehr aufwiesen, zeigten 37 Stämme zwar noch Pseudomycel und Chlamydosporen, wenn auch im Vergleich zur Kontrolle sehr stark verringert. Bei der im Routinebetrieb verwendeten Konzentration von 300 µg/ml (0,03 %), die makroskopisch nur eine mäßige Wachstumshemmung gezeigt hatte, war jetzt mikroskopisch doch eine größere Beeinflussung zu erkennen. 45 Stämme wiesen eine mittlere Hemmung des Pseudomycelwachstums und noch mehr der Chlamydosporenbildung auf. Bei dieser Schädigung durch Kaliumtellurit handelte es sich auch nicht nur um eine Wachstumsverzögerung, da die verminderte Pseudomycel- und Chlamydosporenbildung vom zweiten Tage an während des Beobachtungszeitraumes über 14 Tage gleich stark erhalten blieb.

Weniger stark war die Beeinflussung des Pseudomycel- und Chlamydosporenwachstums bei 100 µg/ml (0,01 %); hier zeigte sich zwar allgemein eine mäßige Verringerung, besonders der Chlamydosporen, aber es gab unter dem Mikroskop bei 34 Stämmen doch noch Stellen mit relativ üppig ausgeprägtem Pseudomycel- und Chlamydosporenwachstum. Eine im Vergleich zur Kontrolle etwa gleich starke Bildung von Chlamydosporen und Pseudomycel zeigte die in der Testreihe niedrigste Konzentration von 50 µg/ml (0,005 %). Aber auch hier waren unter dem Mikroskop schon zum Teil auffällige Beeinflussungen durch Kaliumtellurit an den Sproßzellen zu erkennen.

Während auf der Kontrolle Größe und Farbe der Blastosporen relativ einheitlich waren, zeigte sich schon am zweiten Tag - im Laufe der 14-tägigen Untersuchung dann

deutlicher - mit übersichtlicher Betrachtung (80-fache Vergrößerung) bei den auf Kaliumtellurit gewachsenen Stämmen eine deutliche Farbdifferenz im Überimpfungsstrich. Während in der Mitte des Überimpfungsstriches die Zellen durch ihren Tellurgehalt dunkler gefärbt waren, zeigte sich zum Rande des Striches hin, daß die hinzugewachsenen Zellverbände immer heller, der Kontrolle ähnlicher wurden; das heißt, sie enthielten weniger oder kein Tellur mehr. Deutlicher zeigten sich die Wirkungen des Kaliumtellurit bei den höheren Konzentrationsstufen und bei stärkerer Vergrößerung, zum Teil mit Hilfe der Oelimmersion. Im Vergleich zur relativen Einheitlichkeit des Kontrollbildes kam es unter Kaliumtellurit zu einer ausgeprägten Polymorphie der Blastosporen in Bezug auf Tellurgehalt, Größe und Form. Neben meist im Vergleich zur Kontrolle kleineren, aber verschiedenartig geformten Blastosporen zeigten sich nach Kaliumtellurit unter dem Mikroskop zum Teil große, aufgeblasene, vakuolisierte Zellen mit verschiedener Form von oval bis rund. Vor allem in der Mitte des Überimpfungsstriches konnte man in den meisten Zellen deutliche, flächige, granulierte, dunkel-schwarze Einlagerungen des reduzierten Tellurits erkennen, wodurch der Zellkern mit Nucleolus oft nicht mehr zu erkennen und die membranartige Abgrenzung zur Nachbarzelle nur noch unscharf konturiert war. Daneben gab es aber auch hier noch einige kaum veränderte Sproßzellen, also Übergänge zwischen ganz dunklen und hellen Zellen. Wie die dunkle Färbung durch das eingelagerte Tellur nahm auch die Vielgestaltigkeit der veränderten Sproßzellen zum Rande hin ab, da besonders die großen, vakuolisiert erscheinenden Zellen immer spärlicher wurden. Am Rande des Überimpfungsstriches wurde die Zellstruktur

der Blastosporen wieder einheitlicher, der Kontrolle ähnlicher. Aber auch hier lagen zwischen den meist hellen Zellen noch vereinzelte schwarze Zellen mit reichlich Tellur.

Mit steigender Konzentration konnte man auch beobachten, daß die Einzelzellen des Pseudomycels im Vergleich zur Kontrolle durch Kaliumtellurit länger, uneinheitlicher wurden, wenngleich in geringerem Maße als die Blastosporen. Noch geringer waren die Veränderungen der Chlamydosporen; doch auch sie zeigten ein weniger einheitliches Bild.

Allgemein kann noch darauf hingewiesen werden, daß die Bildung der Chlamydosporen stärker gehemmt wurde als das Pseudomycelwachstum. Abbildung 2 zeigt aber auch, daß die beobachteten Veränderungen mit steigender Kaliumtelluritkonzentration im Nährboden zunahmen. Neben den durch Kaliumtellurit allgemein gehemmten Stämmen fielen 7 Ausnahmen auf, die in den niedrigen Konzentrationsstufen zunächst eine Steigerung der Pseudomycelbildung, in den hohen Konzentrationsstufen aber ebenfalls eine mehr oder weniger starke Hemmung aufwiesen. Nur bei 1 Stamm zeigte sich überall eine leicht vermehrte Pseudomycel- und Chlamydosporenbildung.

Bei der mikroskopischen Untersuchung von Abstrichen des hellen, unpigmentierten Randsaumes auf Reisagar ohne Zusatz ergab sich, daß es sich dabei um wenig Tellur enthaltende, zum Teil vakuolisierte Zellverbände handelte. Diese Beobachtung traf auch für die anderen Hefearten zu.

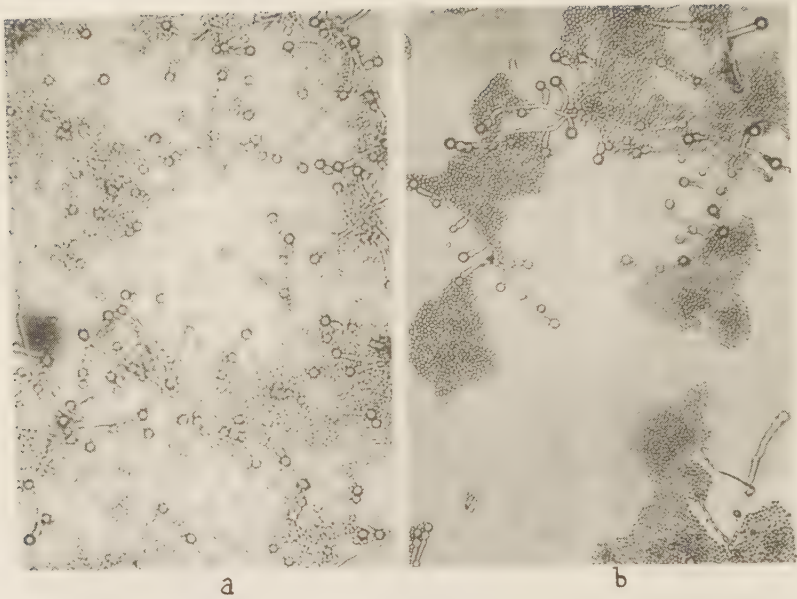
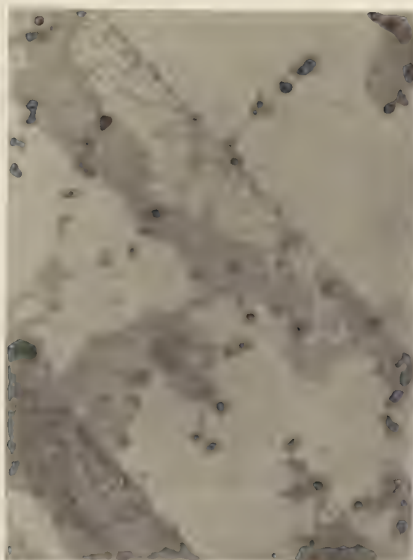


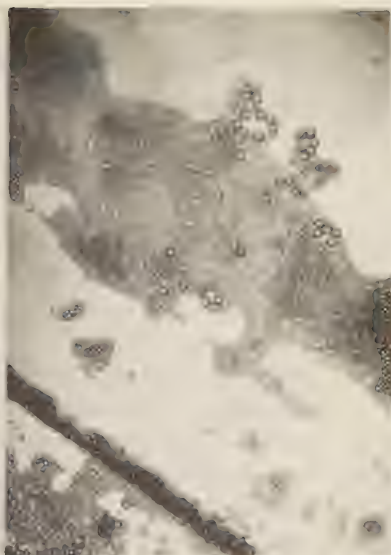
Abb. 2 : Beeinflussung der Pseudomycel- und Chlamydo-
sporenbildung von *Candida albicans* durch Kalium-
telluritzusatz zum Kimmig-Agar, nach Überimpfung
auf Reisagar ohne Zusatz; 7 Tage bei 28°C; etwa
40-fach :

- a) Kontrolle
- b) - e) nach Wachstum auf 50; 100; 300 und 1000
µg/ml (0,005; 0,01; 0,03 und 0,1 %) Ka-
liumtellurit im Nährboden.

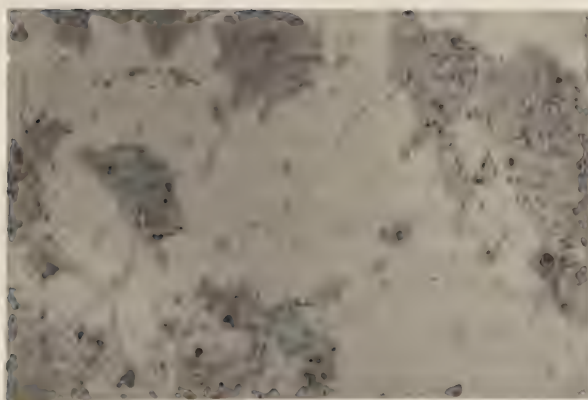
Abb. c, d, e auf der folgenden Seite !



c



d



e

Abb. 2 : c) - e)

Text siehe vorherige Seite

3.2.2.2. Übrige Candida-Arten

Ein Großteil der bei *Candida albicans* gefundenen Ergebnisse gilt auch für die übrigen *Candida*-Arten. Dies betrifft besonders das Verhalten der Blastosporen. Auch hier nahmen Polymorphie, Dichte und Tellurgehalt der Blastosporen mit wachsender Deutlichkeit während der 14-tägigen Untersuchung von der Mitte des Z-förmigen Überimpfungsstriches zum Rande hin ab, wo die Sproßzellen gegenüber der Kontrolle wieder ähnlicher wurden. Ebenso war deutlich zu sehen, daß in der Mitte des Überimpfungsstrichs die Zellen durch Tellurablagerung fast einheitlich schwarz gefärbt waren, während zum Rande hin das Bild mehr streifig wurde; es lagen Zellen mit mehr Tellurgehalt neben Zellen mit weniger Tellurgehalt, so daß sich unter dem Mikroskop mitunter eine zebraartige Fleckung ergab.

Sehr unterschiedlich war die Beeinflussung des Pseudomycelwachstums. Aufgrund der bei *Candida albicans* gewonnenen Resultate war mit einer Hemmung der Pseudomycelbildung durch Kaliumtellurit zu rechnen, obwohl auch bei *Candida albicans* mehrere Stämme nur eine geringe Hemmung des Pseudomycelwachstums und einige sogar eine Steigerung der Pseudomycelbildung aufwiesen.

In den ersten Tagen der mikroskopischen Beobachtung zeigten 23 Stämme eine mehr oder weniger deutliche Vermehrung der Pseudomycelbildung im Vergleich zur Kontrolle. Mit länger dauernder Beobachtung bis zu 14 Tagen glichen sich Kontrolle und Testgruppen wieder einander an. Diese Beobachtung war unabhängig von der Kaliumtelluritkonzen-

tration, auf der die Stämme vorher gewachsen waren. Hierher gehörten 14 Stämme von *Candida parapsilosis*, 5 von *Candida tropicalis*, 3 von *Candida guilliermondii* sowie 1 *Candida krusei*-Stamm.

Nur 12 *Candida*-Stämme zeigten die vor der Auswertung erwartete Beeinflussung der Pseudomycelbildung durch Kaliumtellurit. Hier sah man eine Hemmung des Pseudomycelwachstums in deutlicher Abhängigkeit von der Kaliumtelluritkonzentration. Diese Verminderung war bei 4 Stämmen so stark, daß nach Abimpfen von der üblicherweise verwendeten Konzentration keine Pseudomycelbildung mehr nachweisbar war.

Eine dritte kleine Gruppe zeigte überhaupt keine Veränderung der Pseudomycelbildung. Dazu zählten der einzige Vertreter der Art *Candida lipolytica* und 2 Stämme der Art *Candida pseudotropicalis*.

Allen Gruppen war aber gemeinsam, daß nach Einwirkung von Kaliumtellurit die Einzelglieder des Pseudomycels vielgestaltiger und zum Teil dünner und länger waren; auch enthielten sie noch mehr oder weniger intrazelluläres Tellur.

3.2.2.3. *Trichosporon species*

Die (besonders bei *Trichosporon cutaneum*) verhältnismäßig großen, oft sechseckig-ovalen Blastosporen zeigten auch hier mit steigender Konzentration von Kaliumtellurit im Nährboden ein polymorphes Zellbild, das aber im Vergleich zur Kontrolle nicht sehr ausgeprägt war. Vor allem fielen bei dieser Gattung nur wenige große, vakuolisierte Zellen auf. Auch hier wurde das

Zellbild am Rande des Überimpfungsstriches wieder einheitlicher und der Kontrolle gleicher.

Interessant war bei *Trichosporon species* die Pigmentierung durch das abgelagerte reduzierte Tellurit, da unter dem Mikroskop auch bereits in der Mitte des Überimpfungsstriches eine fleckförmige, uneinheitlich verteilte Tellurablagerung zu sehen war. Hier lagen Zellhaufen mit sehr wenig oder keinem Tellur neben total dunkel gefärbten Zellhaufen. Natürlich gab es auch Zellen mit allen Farbübergängen (mit mehr oder weniger Tellurgehalt), doch dieses pantherartige Bild blieb abnehmend bis zum Rande der Kultur bzw. des Überimpfungsstriches bestehen. Der Großteil der Zellen zeigte entweder eine starke Verfärbung durch Tellur oder aber fast überhaupt keine. Ein Abstrich von diesen tellurlosen Zellhaufen auf anderen kaliumtellurithaltigen Nährboden ergab aber normales Verhalten, das heißt, grauer Verfärbung der Kultur durch reduziertes Tellurit.

Auch die Bildung der Hyphen, die Septierung der Hyphen und ihr Zerfall in Arthrosporen unterlag einer Beeinflussung durch Kaliumtellurit. Während der ersten Tage der mikroskopischen Auswertung war in Abhängigkeit von der Kaliumtelluritkonzentration, am stärksten bei der maximalen nicht total hemmenden Konzentration von 300 µg/ml (0,03 %), eine verminderte Mycelbildung, eine verspätete und geringere Bildung von Septen und ein verzögerter Zerfall in Arthrosporen zu beobachten. Dies traf bis auf eine einzige Ausnahme auf alle untersuchten Stämme zu. Nur bei einem *Trichosporon capitatum*-Stamm kam es sogar zu einer leichten Vermehrung von septierten

Hyphen und zu einem beschleunigten Zerfall in Arthrosporen. Im Laufe der weiteren Beobachtung (ab dem siebten Tag) war bei den meisten Stämmen im Vergleich zur Kontrolle keine Verminderung von Mycel und Arthrosporen mehr zu beobachten; nur bei 5 Stämmen (3 *Trichosporon cutaneum*- und 2 *Trichosporon capitatum*-Stämme) blieb auch bis zum 14. Tag der mikroskopischen Auswertung eine Verminderung des Mycels und der Arthrosporen bestehen (Abb. 3).

Im Mycel und in den Arthrosporen waren teilweise deutliche Tellurablagerungen mikroskopisch zu sehen. Bei 2 *Trichosporon cutaneum*-Stämmen wurde beobachtet, daß durch Kaliumtellurit die einzelnen Hyphen gewundener, weniger gestreckt und länger als auf der Kontrolle wuchsen, wodurch das Mycel verflochtener wirkte. Die Arthrosporen erschienen allgemein länger, schmaler und weniger geschlossen beisammenliegend. Ein auffallender Unterschied im Verhalten der einzelnen Arten konnte nicht festgestellt werden.



Abb. 3 : Beeinflussung der Blastosporen und Mycel- bzw. Arthrosporenbildung durch Kaliumtellurit bei *Trichosporon cutaneum* (nach Überimpfung von Kimmig-Agar auf Reisagar ohne Zusatz). 3 Tage bei 28°C; etwa 40-fach:
a) Kontrolle; b) nach Wachstum auf 300 µg/ml (0,03 %) Kaliumtellurit im Nährboden. Näheres siehe Text !

3.3. EMPFINDLICHKEITSTESTUNG VON ACTI-DIONE (CYCLOHEXIMID)

3.3.1. Makroskopische Untersuchungsergebnisse

3.3.1.1. Candida species

Candida albicans :

Alle *Candida albicans*-Stämme wurden wie die übrigen Hefen in 5 Konzentrationsstufen von 10 - 4000 µg/ml (0,001 - 0,4 %) Acti-dione im Nährboden getestet. Dabei erwies sich *Candida albicans* als sehr unempfindlich gegenüber Acti-dione. Trotzdem unterlag auch diese Art in hohen Konzentrationen einer Beeinflussung durch Acti-dione, während alle übrigen geprüften Sproßpilze schon in wesentlich geringeren Konzentrationen geschädigt wurden. An Hand der Tabelle 11 ist ferner auch ersichtlich, daß durch die in der mykologischen Routinediagnostik am häufigsten verwendeten Konzentration von 500 µg/ml (0,05 %) das Wachstum dieses bedeutendsten Hefepilzes in keinem Falle auch nur annähernd total unterdrückt würde. Auch geht hervor, daß mit steigender Acti-dione-konzentration im Nährboden das Wachstum zunehmend beeinflusst wurde.

Da 50 Stämme bei der höchsten getesteten Konzentration von 4000 µg/ml (0,4 %) nur leicht oder mittel gehemmt wurden, kann man in diesem Falle nichts über die maximale nicht total hemmende Konzentration aussagen. Nur 2 Stämme wurden bei dieser Konzentration total gehemmt. Trotzdem wurde die Testreihe nicht mehr erweitert, da noch höhere Konzentrationen von Acti-dione im Nährboden nur theoretisches Interesse haben und in der Praxis schwierig steril herzustellen sind. Bei der nächst-

niedrigen Konzentration von 2000 µg/ml (0,2 %) zeigten 45 Stämme leicht gehemmtes, 7 Stämme aber ungehindertes Wachstum. Ähnlich war das Verhalten von *Candida albicans* auch bei 1000 µg/ml (0,1 %). Bei 100 µg/ml (0,01 %) erwiesen sich 43 Stämme als ungehemmt; bei der niedrigsten Konzentration von 10 µg/ml (0,001 %) zeigten nur 3 Stämme eine geringe Wachstumshemmung, während 49 Stämme ungehindert wuchsen. Vergleiche auch Abb. 4 !

Allgemein sah es in den ersten Tagen der Ablesung nach einer stärkeren Wachstumshemmung als nach zweiwöchiger Beobachtungszeit aus. Offensichtlich wurde das Wachstum durch Acti-dione in Abhängigkeit von der Konzentration auch um 2 - 4 Tage verzögert. Auffallend war noch, daß bei 39 Stämmen die entsprechend der inokulierten Schlangenlinie gewundene Kulturform auf den hohen Acti-dione-konzentrationen zunehmend verschmierter und flächenförmiger wurde, wie wenn die Stämme mit einem geraden Überimpfungsstrich inokuliert worden wären. Ein Randsaum wie bei Kaliumtellurit wurde nicht beobachtet.

Die Oberfläche der Kolonien wurde mit steigender Konzentration schmieriger und bekam im Vergleich zur weißlichen Mattigkeit der Kontrollkultur einen wässrig-cremigen Glanz, der bei den meisten Stämmen leicht ins Gelbliche spielte. Die Textur der Pilze wurde nicht verändert.

Tabelle 11 : Wirkung von Acti-dione (Cycloheximid) auf das Wachstum der Candida-Arten
(Ablesung nach 14 Tagen)

Bezeichnung der getesteten Stämme	Anzahl der getesteten Stämme	Anzahl der Stämme, die kein Wachstum -Ø-, mehr oder weniger gehemmtes Wachstum -(+)- oder volles Wachstum - + - zeigten. Acti-dione-kon- zentrationen in µg/ml und % angegeben							
		4000	2000	1000	100	10 µg/ml			
		0,4	0,2	0,1	0,01	0,001 Vol. %			
		Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +			
Candida albicans	52	2 50 -	- 45 7	- 41 11	- 9 43	- 3 49			
Candida parapsilosis	19	- - -	19 - -	17 2 -	14 5 -	2 16 1			
Candida tropicalis	9	- - -	9 - -	7 2 -	5 4 -	- 9 -			
Candida guilliermondii	4	- - -	4 - -	3 1 -	2 2 -	- 4 -			
Candida pseudotropicalis	3	- - -	3 - -	3 - -	3 - -	- 3 -			
Candida krusei	2	- - -	2 - -	2 - -	2 - -	1 1 -			
Candida lipolytica	1	- - -	1 - -	1 - -	- 1 -	- 1 -			
Gesamtzahlen	90	40 50 -	38 45 7	33 46 11	26 21 43	3 37 50			

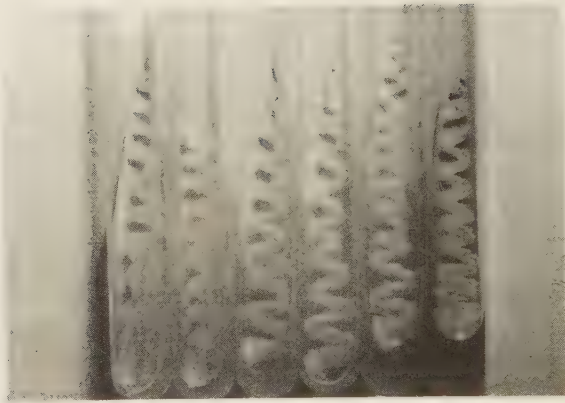


Abb. 4 : Beeinflussung des Wachstums von *Candida albicans* durch Acti-dione auf Kimmig-Agar.
Ablesung nach 14 Tagen von rechts nach links :
Kontrolle, dann 10; 100; 1000; 2000 und 4000 $\mu\text{g/ml}$ (0,001; 0,01; 0,1; 0,2 und 0,4 %) Acti-dione im Nährboden.

Übrige Candida-Arten :

Die makroskopische Beeinflussung von Acti-dione auf die übrigen *Candida*-Arten ist zusammenfassend ebenfalls aus Tabelle 11 ersichtlich.

Deutlich wird, daß die übrigen *Candida*-Arten wesentlich empfindlicher gegenüber Acti-dione sind als *Candida albicans*. So lag die maximale nicht total hemmende Konzentration für 23 Stämme schon bei der geringsten Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ (0,001 %), für 7 Stämme bei 100

$\mu\text{g/ml}$ (0,01 %) und für 5 Stämme bei 1000 $\mu\text{g/ml}$ (0,1 %) Acti-dione im Nährboden. 3 Stämme wurden bereits bei der niedrigsten Konzentration total gehemmt. Bei 2000 $\mu\text{g/ml}$ (0,2 %) zeigte kein einziger Stamm mehr Wachstum.

Die Tabelle 11 beweist auch, daß die im mykologischen Labor verwendete Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ (0,05 %) bereits den größten Teil der *Candida species*-Stämme (ohne *Candida albicans*) hemmen würde. Auch hier wurde das Wachstum in Abhängigkeit von der Acti-dionekonzentration im Nährboden beeinflußt, wobei es anfänglich jeweils nach einer stärkeren Wachstumshemmung bei den einzelnen Konzentrationsstufen aussah, da es zu einer Wachstumsverzögerung von 2 - 3 Tagen kam.

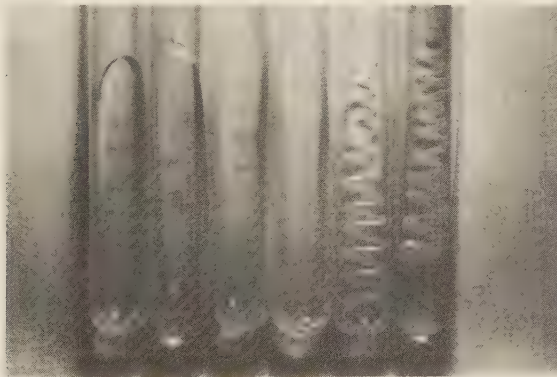


Abb. 5 : Beeinflussung von *Candida parapsilosis* durch Acti-dione auf Kimmig-Agar. Ablesung nach 14 Tagen, von rechts nach links: Kontrolle, dann 10; 100; 1000; 2000 und 4000 $\mu\text{g/ml}$ (0,001; 0,01; 0,1; 0,2 und 0,4 %) Acti-dione im Nährboden.

Die Oberfläche der in Zick-Zack-Linie inokulierten Stämme wurde nach Einwirkung von Acti-dione cremiger und wässrig-glänzender; die Farbe wirkte dunkler, von weißlich in einen gelblichen Farbton spielend. Die Form der Kolonien und die Textur der Hefepilze wurde dagegen nicht verändert.

Vergleiche dazu Abbildung 5 !

Betrachtet man die einzelnen Candida-Arten (ohne *Candida albicans*), so fällt auf, daß *Candida tropicalis* und *Candida guilliermondii* widerstandsfähiger gegenüber Acti-dione zu sein scheinen als vor allem *Candida parapsilosis* und *Candida pseudotropicalis*. Bei *Candida parapsilosis* ergab sich aber auch eine deutliche Uneinheitlichkeit im Verhalten einer Art gegenüber Acti-dione. Während 2 Stämme bereits bei 10 µg/ml (0,001 %) total gehemmt wurden, zeigten 2 weitere Stämme auch bei 1000 µg/ml (0,1 %) noch schwaches Wachstum.

3.3.1.2. Torulopsis species

Die Stämme der Gattung *Torulopsis* wurden nur makroskopisch auf Kimmig-Agar untersucht. Die maximale nicht total hemmende Konzentration war bei den einzelnen Arten und Stämmen sehr unterschiedlich und bewegte sich von der niedrigsten bis zur höchsten Konzentration der Testreihe. Von Ausnahmen abgesehen kann man feststellen, daß sich diese Gattung relativ empfindlich gegenüber Acti-dione verhielt, da bei der in der mykologischen Routinepraxis verwendeten Konzentration von 500 µg/ml (0,05 %) bereits fast die Hälfte aller Stämme (17 von 38) kein Wachstum mehr gezeigt hätte. Vergleiche dazu Tabelle 12 !

Tabelle 12 : Wirkung von Acti-dione auf das Wachstum der Torulopsis-Arten.
(Ablesung über insgesamt 14 Tage)

Bezeichnung der getesteten Stämme	Anzahl der getesteten Stämme	Anzahl der Stämme, die kein Wachstum -Ø-, mehr oder weniger ge- hemmtes Wachstum -(+)- oder volles Wachstum - + - zeigten. Acti-dionekonzentrationen in µg/ml und % angegeben.						
		4000	2000	1000	100	10 µg/ml		
		0,4	0,2	0,1	0,01	0,001 Vol. %		
		Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +
Torulopsis famata	13	13 - -	11 2 -	10 3 -	6 7 -	- 11 2		
Torulopsis sake	7	3 4 -	1 6 -	1 6 -	- 5 2	- 1 6		
Torulopsis dattila	5	5 - -	4 1 -	3 2 -	1 4 -	- 2 3		
Torulopsis glabrata	4	4 - -	4 - -	4 - -	4 - -	- 4 -		
Torulopsis candida	4	4 - -	4 - -	2 2 -	2 2 -	- 4 -		
Torulopsis utilis	2	2 - -	2 - -	2 - -	2 - -	1 1 -		
Torulopsis inconspicua	1	1 - -	1 - -	1 - -	1 - -	1 - -		
Torulopsis gropengiesseri	1	1 - -	1 - -	1 - -	1 - -	- 1 -		
Torulopsis stellata	1	1 - -	- 1 -	- 1 -	- 1 -	- - 1		
Gesamtzahlen	38	30 8 -	28 10 -	24 14 -	17 19 2	2 24 12		

Die Tabelle zeigt auch, daß die Stärke der Wachstums-
hemmung von der Acti-dionekonzentration des Nährbodens
abhängig war, wobei es anfänglich noch zu einer leichten
Wachstumsverzögerung von 1 bis 2 Tagen kam. Diese Wachs-
tumshemmung blieb während des gesamten Beobachtungszeit-
raumes von 14 Tagen erhalten.

Unabhängig von den einzelnen Arten kam es auch hier -
wie schon bei der Kaliumtellurit-Testung beschrieben -
bei 10 Stämmen im Verlauf der kontinuierlich inokulierten
Schlangenlinie mit steigender Konzentration zu einem
zunehmend punktförmigen Wachstum, wie Abbildung 6 zeigt.

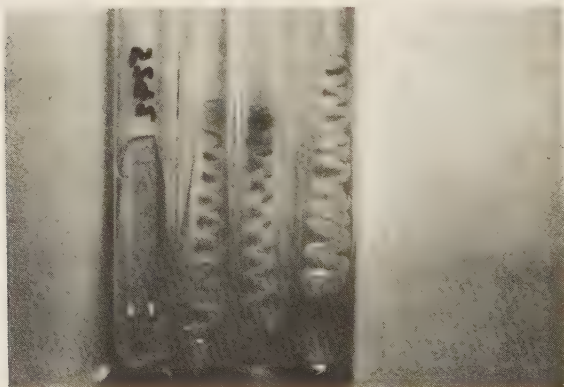


Abb. 6 : Beeinflussung eines Stammes von *Torulopsis famata*
durch Acti-dione auf Kimmig-Agar. Ablesung nach
14 Tagen von rechts nach links : Kontrolle, dann
10 µg/ml (0,001 %); 100 µg/ml (0,01 %) und 1000
µg/ml (0,1 %) Acti-dione im Nährboden, wo bereits
kein Wachstum mehr zu erkennen ist.

Beachte auch das zunehmende punktförmige Wachstum
im Verlauf der inokulierten Schlangenlinie !

Die Oberfläche der Kolonien wurde mit steigender Konzentration glänzender, cremiger; die Farbe spielte mehr ins Gelbliche. Die Textur der Pilze wurde nicht verändert.

Bei einem abschließenden Vergleich der Arten dieser Gattung fiel auf, daß *Torulopsis glabrata*, *Torulopsis utilis*, *Torulopsis gropengiesseri* und *Torulopsis inconspicua* bereits bei der niedrigsten Konzentration von 10 µg/ml (0,001 %) mehr oder weniger stark gehemmt wurden und bei 100 µg/ml (0,01 %) schon kein Wachstum mehr zeigten. Innerhalb ihrer Gattung reagierten diese Arten am empfindlichsten gegenüber Acti-dione.

Weniger, aber dennoch stark empfindlich, erwiesen sich *Torulopsis famata*, *Torulopsis dattila* und *Torulopsis candida*, wo vereinzelte Stämme auch bei 1000 µg/ml (0,1 %) bzw. 2000 µg/ml (0,2 %) noch schwaches Wachstum zeigten.

Am widerstandsfähigsten gegenüber Acti-dione war in dieser Testreihe *Torulopsis sake*, da trotz zunehmender Wachstumsbeeinflussung mit steigender Konzentration 4 von den 7 getesteten Stämmen auch bei 4000 µg/ml (0,4 %) nur mittel gehemmtes Wachstum zeigten. Wenig empfindlich war auch der einzige Vertreter der Art *Torulopsis stellata*.

3.3.1.3. Trichosporon species

Die verschiedenen Arten erwiesen sich bei der makroskopischen Testung als recht unterschiedlich empfindlich gegenüber Acti-dione, wie Tabelle 13 zeigt.

Tabelle 13 : Wirkung von Acti-dione auf das Wachstum der Trichosporon-Arten und Cryptococcus neoformans. (Ablesung über insgesamt 14 Tage)

Bezeichnung der getesteten Stämme	Anzahl der getesteten Stämme	Anzahl der Stämme, die kein Wachstum -Ø-, mehr oder weniger gehemmtes Wachstum -(+)- oder volles Wachstum - + - zeigten. Acti-dionekonzentrationen in µg/ml und % angegeben						
		4000	2000	1000	100	10 µg/ml		
		0,4	0,2	0,1	0,01	0,001 Vol. %		
		Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +
Trichosporon cutaneum	11	9 2 -	7 4 -	4 7 -	- 9 2	- 4 7	- 4 7	- 4 7
Trichosporon capitatum	6	6 - -	6 - -	5 1 -	4 2 -	- 6 -	- 6 -	- 6 -
Trichosporon pullulans	2	2 - -	2 - -	2 - -	- 2 -	- 2 -	- 2 -	- 2 -
Trichosporon fermentans	1	1 - -	1 - -	- 1 -	- 1 -	- 1 -	- 1 -	- 1 -
Trichosporon gesamt	20	18 2 -	16 4 -	11 9 -	4 14 2	- 10 10	- 10 10	- 10 10
Cryptococcus neoformans	6	6 - -	6 - -	6 - -	5 1 -	2 4 -	2 4 -	2 4 -

Bei dem Hauptvertreter dieser Gattung, *Trichosporon cutaneum*, reichte die maximale nicht total hemmende Konzentration von 100 µg/ml (0,01 %) bis zur höchsten Konzentration von 4000 µg/ml (0,4 %). Von den 11 Stämmen dieser Art zeigten bei der niedrigsten Konzentration von 10 µg/ml (0,001 %) 7 Stämme ungehemmtes Wachstum und 4 Stämme wurden leicht gehemmt. Bei der nächst höheren Konzentration von 100 µg/ml (0,01 %) zeigten nur noch 2 Stämme ungehemmtes Wachstum, 9 Stämme dagegen leicht bis mittel gehemmtes Wachstum. Bei 1000 µg/ml (0,1 %) wurden 4 Stämme bereits total, 7 Stämme nur mittel gehemmt. Bei 2000 µg/ml (0,2 %) waren 7 Stämme im Wachstum ganz unterdrückt und 4 zeigten mittel bis stark reduziertes Wachstum, während bei 4000 µg/ml (0,4 %) nur noch 2 Stämme stark bis fast total gehemmt wuchsen und 9 Stämme gänzlich in ihrem Wachstum unterdrückt waren.

An Hand der tabellarischen Ergebnisse muß bei der routinemäßig verwendeten Konzentration von 300 µg/ml (0,03 %) bzw. 500 µg/ml (0,05 %) damit gerechnet werden, daß ein Teil der *Trichosporon cutaneum*-Kulturen bereits stark im Wachstum unterdrückt wird.

Im Vergleich zur Kontrolle wurde die Farbe der Kolonien durch die Acti-dioneeinwirkung cremiger, weißlicher, bei den hohen Konzentrationen teilweise wässrig-glänzender und gelblich. Die Form der Kolonien wurde nur bei 4 Stämmen verändert, wo bei den höheren Konzentrationen vereinzelt punktförmiges Wachstum im Verlauf der inokulierten Schlangenlinie auftrat. Siehe auch Abbildung 7 !

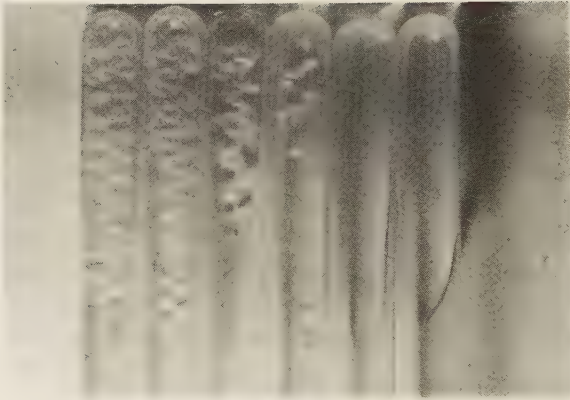


Abb. 7 : Beeinflussung eines Stammes von *Trichosporon cutaneum* durch Acti-dione auf Kimmig-Agar. Able-
sung nach 14 Tagen von rechts nach links :
Kontrolle, dann 10; 100; 1000; 2000 und 4000
 $\mu\text{g/ml}$ (0,001; 0,01; 0,1; 0,2; und 0,4 %) Acti-
dione im Nährboden, wo bereits kein Wachstum mehr
zu erkennen ist.
Beachte vor allem auch die deutliche, in Abhängig-
keit zur Acti-dionekonzentration zunehmende
Wachstumshemmung !

Auch die Textur wurde durch Acti-dione verändert, da bei
Abimpfung von den hohen Konzentrationen die Kolonien in
sich und mit dem Nährboden nicht mehr so fest zusammen-
hängen und im Vergleich zur Kontrolle leichter abzuimpfen
waren.

Wesentlich empfindlicher gegenüber Acti-dione reagierte *Trichosporon capitatum*. Hier zeigte bei 1000 µg/ml (0,1 %) von den 6 untersuchten Stämmen nur noch 1 Stamm stark gehemmtes Wachstum, während 5 Stämme bereits total gehemmt waren. Sogar bei 100 µg/ml (0,01 %) waren 4 Stämme bereits ganz in ihrem Wachstum unterdrückt, während 2 Stämme noch mittel gehemmtes Wachstum zeigten. Nur bei der niedrigsten Konzentration von 10 µg/ml (0,001 %) war kein Stamm total unterdrückt, alle Stämme zeigten aber mittel bis stark gehemmtes Wachstum. Bei der im Labor verwendeten Routinekonzentration hätte also nur noch 1 Stamm von 6 untersuchten Stämmen geringes Wachstum gezeigt.

Farbe, Form und Oberfläche der Stämme waren analog des bei *Trichosporon cutaneum* Gesagten verändert und beeinflusst.

Die maximale nicht total hemmende Konzentration lag für die 2 *Trichosporon pullulans*-Stämme bei 100 µg/ml (0,01 %); für den *Trichosporon fementans*-Stamm bei 1000 µg/ml (0,1 %).

Im Vergleich zu den anderen imperfekten Hefen waren bei *Trichosporon species* die stärksten makroskopischen Veränderungen durch Acti-dione zu beobachten. Die auf der Kontrolle stark gewundenen, gewölbten, fein- bis grobfaltigen Oberflächen erschienen mit steigender Acti-dionekonzentration flacher und glatter. Die "gebirgig" erscheinenden Oberflächen wurden zunehmend ebener und samtiger, die Windungen verstrichen zusehends. Siehe Abbildung 8 !

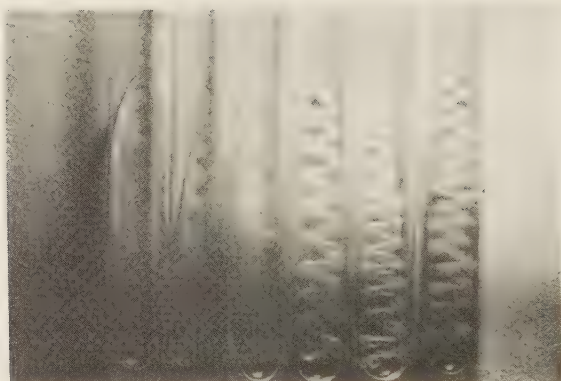


Abb. 8 : Beeinflussung eines Stammes von *Trichosporon capitatum*. Hier im Bild der Stamm, der sich am wenigsten empfindlich erwiesen hatte und ähnlich empfindlich gegenüber Acti-dione reagierte wie *Trichosporon cutaneum*. Ablesung nach 14 Tagen von rechts nach links : Kontrolle, dann 10; 100; 1000; 2000 und 4000 µg/ml (0,001; 0,01; 0,1; 0,2 und 0,4 %) Acti-dione im Nährboden.

Beachte die makroskopisch deutliche Veränderung der Oberfläche des Pilzes ! Näheres siehe Text !

Zusammenfassend für die ganze Gattung gilt, daß hier keine Wachstumsverzögerung festgestellt wurde. Im Gegensatz dazu konnte eine Beeinflussung der Wachstumsstärke jeweils immer erst ab dem dritten bzw. vierten Tag beobachtet werden. Die Wachstumshemmung war bis zum achten Tag des Beobachtungszeitraumes am deutlichsten ausgeprägt. Im weiteren

Verlauf der zweiwöchigen Untersuchung kam es allgemein wieder mehr zu einer Angleichung an die Kontrolle, obwohl auch dann noch die Wachstumshemmungen durch Acti-dione zu erkennen waren, wie die Abbildungen 7 und 8 be- weisen.

Ferner ist aus der Tabelle 13 noch zu entnehmen, daß die Wachstumsunterdrückung weitgehend von der Höhe der Acti-dionekonzentration im Nährboden abhängt.

3.3.1.4. Cryptococcus species

Die 6 Stämme der Gattung *Cryptococcus*, durch die Art *Cryptococcus neoformans* vertreten, wurden nur makros- kopisch untersucht. Wie Tabelle 13 zeigt, war diese Art sehr empfindlich gegenüber Acti-dione. Die maxi- male nicht total hemmende Konzentration war für 3 Stämme bereits bei 10 µg/ml (0,001 %) und für 1 Stamm bei 100 µg/ml (0,01 %). 2 Stämme wurden bereits bei der niedrigsten Konzentration von 10 µg/ml (0,001 %) total gehemmt; weitere 3 Stämme zeigten bei 100 µg/ml (0,01 %) kein Wachstum mehr und der widerstandsfähigste Stamm wurde bei 1000 µg/ml (0,1 %) total im Wachstum unter- drückt. Siehe dazu Abb. 9 !

Die Farbe der Kolonien wurde nach Acti-dione cremiger und gelblicher, die Form der inokulierten Schlangenlinie etwas verschmierter und flächenhafter. Oberfläche und Textur des Pilzes blieben unverändert. Bei dieser Art wurde noch zusätzlich untersucht, ob durch Acti-dione die Hefestärkebildung verändert oder gar ganz einge- stellt wird.

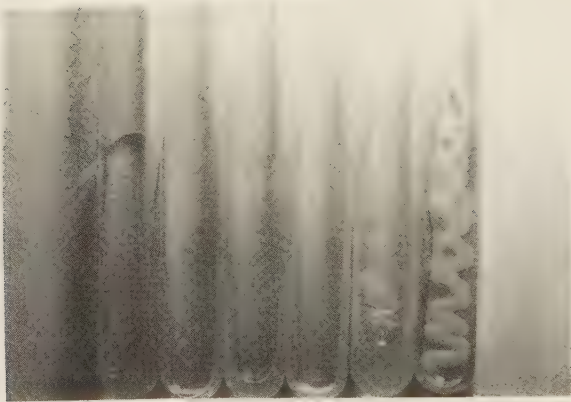


Abb. 9 : Beeinflussung von *Cryptococcus neoformans* durch Acti-dione auf Kimmig-Agar. Ablesung nach 14 Tagen Wachstum von rechts nach links : Kontrolle; dann 10 µg/ml (0,001 %), wo das Wachstum bereits total gehemmt wird; dann 100; 1000; 2000 und 4000 µg/ml (0,01; 0,1; 0,2; und 0,4 %) Acti-dione im Nährboden (alle ohne Wachstum).

Auf den mit Yestolate-Hefeextrakt versehenen Testplatten gelang bei allen Stämmen sowohl jeweils für die Kontrollen wie auch für die Acti-dionekonzentrationen, die noch Wachstum zuließen, der Nachweis von Hefestärke. Nur bei 1 Stamm fiel die Jod-Stärke-Reaktion im Vergleich zur dunkelblau-schwarzen Färbung der Kontrolle nach Wachstum des Pilzes auf Acti-dione deutlich sichtbar schwächer aus. Bei den übrigen Stämmen konnte keine

erkennbare Verminderung der Hefestärkebildung durch die Jod-Reaktion nach Acti-dioneeinwirkung im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden.

3.3.1.5. Rhodotorula species

Auch diese Gattung, die nur makroskopisch untersucht wurde, erwies sich als sehr empfindlich gegenüber Acti-dione. Tabelle 14 zeigt ferner deutlich, daß die Arten dieser Gattung relativ einheitlich in ihrem Wachstum durch Acti-dione beeinflußt wurden, da alle Stämme ab 1000 µg/ml (0,1 %) total im Wachstum gehemmt wurden.

Die maximale nicht total hemmende Konzentration lag für 28 Stämme (von 33 getesteten) bei 100 µg/ml (0,01 %) und für 5 Stämme sogar bei der niedrigsten Konzentration von 10 µg/ml (0,001 %). Auch bei dieser Gattung muß deshalb damit gerechnet werden, daß ein Teil der Stämme durch die im Labor verwendete Routinekonzentration am Angehen in der Schrägagarkultur gehindert wird.

Vergleicht man die einzelnen Arten, so ist bemerkenswert, daß *Rhodotorula rubra* gegenüber Acti-dione empfindlicher reagierte als *Rhodotorula mucilaginosa* oder *Rhodotorula glutinis*. Während *Rhodotorula mucilaginosa* und *glutinis* bei 100 µg/ml (0,01 %) mittel gehemmt wurden, zeigten 4 Stämme von *Rhodotorula rubra* hier bereits kein Wachstum mehr; die restlichen 3 *Rhodotorula rubra*-Stämme wurden bei dieser Konzentration stark bis mittel gehemmt. Bei 10 µg/ml (0,001 %) war der Großteil der Stämme nur leicht gehemmt (neben 9 unbeeinflußten Stämmen), während mit Ausnahme von 2 widerstandsfähigen Stämmen 5 *Rhodotorula rubra*-Stämme bei dieser Konzentration bereits mittel gehemmt wurden (Vergleiche Abbildung 10).

Tabelle 14 : Wirkung von Acti-dione auf das Wachstum der Rhodotorula-Arten
(Ablesung über insgesamt 14 Tage)

Bezeichnung der getesteten Stämme	Anzahl der getesteten Stämme	Anzahl der Stämme, die kein Wachstum -Ø-, mehr oder weniger gehemmtes Wachstum -(+)- oder volles Wachstum - + - zeigten. Acti-dionekonzentrationen in µg/ml und % angegeben						
		4000	2000	1000	100	10 µg/ml		
		0,4	0,2	0,1	0,01	0,001 Vol. %		
		Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +	Ø (+) +
Rhodotorula mucilaginosa	21	21 - -	21 - -	21 - -	21 - -	- 14 7	-	-
Rhodotorula rubra	7	7 - -	7 - -	7 - -	4 3 -	- 5 2	-	-
Rhodotorula glutinis	3	3 - -	3 - -	3 - -	3 - -	- 3 -	-	-
Rhodotorula minuta	1	1 - -	1 - -	1 - -	1 - -	- 1 -	-	-
Rhodotorula pallida	1	1 - -	1 - -	1 - -	1 - -	- 1 -	-	-
Gesamtzahlen	33	33 - -	33 - -	33 - -	5 28 -	- 24 9	-	-

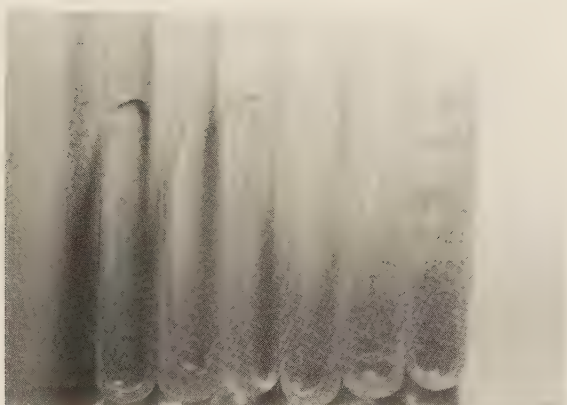


Abb. 10 : Beeinflussung von *Rhodotorula rubra* durch Acti-dione auf Kimmig-Agar. Ablesung nach 14 Tagen von rechts nach links : Kontrolle; dann 10 $\mu\text{g/ml}$ (0,001 %) mit mittel gehemmtem Wachstum; dann 100; 1000; 2000 und 4000 $\mu\text{g/ml}$ (0,01; 0,1; 0,2 und 0,4 %) Acti-dione im Nährboden (alle ohne Wachstum).

Auch bei dieser Gattung nimmt die Wachstumsstärke mit zunehmender Acti-dionekonzentration ab. Erwähnenswert ist noch, daß es in den ersten Tagen der Auswertung zu ein- bis zweitägigen Wachstumsverzögerungen kam.

Unabhängig von der jeweiligen Art wurde die Form der Kolonie bei 10 Stämmen mit steigender Acti-dionekonzentration verschmierter und großflächiger; bei 8 Stämmen traten wiederum kleine Rundkolonien auf.

Die Oberfläche der Pilze wurde durch Acti-dione cremiger und glänzender. Die Textur der Pilze wurde nicht verändert.

Interessant war aber vor allem das Verhalten der für diese Gattung typischen Pigmentierung. Bei 25 untersuchten Rhodotorula-Hefen wurde in den ersten 5 bis 7 Tagen der Auswertung der rote Farbton zarter und heller, fast rosafarben, während er folgend, bis zum Ende des 14-tägigen Beobachtungszeitraumes, wieder an Farbintensität zunahm und im Vergleich zur Kontrolle wieder kräftiger pigmentiert erschien. Nur 2 Stämme von Rhodotorula glutinis und 3 Stämme von Rhodotorula rubra behielten auch nach 14 Tagen noch ihren helleren Farbton.

3.3.1.6. Ergebnisse der Rückimpfungsversuche

Candida albicans :

Nach Rückimpfung auf Kimmig-Agar ohne Zusatz zeigten die Stämme mit abnehmender Acti-dionekonzentration eine zunehmende Regeneration. Auch bei Subkultur von der höchsten Konzentrationsstufe war das Wachstum jetzt makroskopisch unbeeinflusst und nahezu ohne Wachstums-
hemmung.

Candida species :

Sogar bei Rückimpfung von der maximalen nicht total hemmenden Konzentration wurde das Wachstum nach anfänglicher Verzögerung von 3 - 4 Tagen wieder normal. Vereinzelt waren aber noch punktförmige Kolonien sichtbar; die Oberflächen erschienen im Vergleich zur Kontrolle cremiger und glänzender.

Torulopsis species :

Vor allem *Torulopsis famata* zeigte nach Rückimpfung von der maximalen nicht total hemmenden Konzentration noch eine leichte Hemmung mit zahlreichen punktförmigen Kolonien und glänzender Oberfläche. Von den übrigen Konzentrationsstufen erholten sich die Stämme gänzlich.

Trichosporon species :

Diese Gattung regenerierte sich auf der Subkultur von allen Konzentrationsstufen in der Wachstumsstärke vollständig. Bei der maximalen nicht total hemmenden Konzentration blieb aber die makroskopische Veränderung der Oberfläche zum Teil erhalten.

Cryptococcus neoformans :

Auch diese Stämme, die sehr empfindlich gegenüber Actidione reagiert hatten, brachten auf der Subkultur ohne Actidione eine Wachstumserholung.

Rhodotorula species :

Nach Rückimpfung von den unteren Konzentrationen zeigten diese Hefen eine ausgeprägte Erholung in ihrem Wachstum; nach Subkultur von der maximalen nicht total hemmenden Konzentration blieb aber noch eine leichte Wachstumshemmung erhalten. Die Pigmentierung erschien wieder kräftiger rot. Die cremige Oberfläche und das Auftreten punktförmiger Kolonien blieben aber erhalten.

3.3.2. Mikroskopische Untersuchungsergebnisse

Mikroskopisch wurden nur *Candida albicans*, *Candida species* (ohne *Candida albicans*) und *Trichosporon species* untersucht. Dabei wurde auf die maximale nicht total hemmende

Konzentration besondere Bedeutung gelegt, weil nach dieser Konzentration die größten Beeinflussungen der typischen Wuchsformen zu erwarten waren. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte auf Reisagar ohne Zusatz nach Abimpfung von den acti-dionehaltigen Kimmig-Nährböden, da sich hier die speziellen Merkmale erst ausbilden können.

3.3.2.1. Candida albicans

Bereits bei 80-facher mikroskopischer Vergrößerung fiel bei den Kulturen, die vorher auf Acti-dione gewachsen waren, eine im Vergleich zur Kontrolle deutliche Polymorphie des Zellbildes auf. Während die Sproßzellen auf der Kontrollkultur einheitlich in Form und Größe wuchsen, wurden die Blastosporen nach Beeinflussung durch Acti-dione in deutlicher Abhängigkeit von der Konzentration zunehmend ungleicher und vielgestaltiger in Größe, Form und Lage, wobei die Zellen vor allem länglicher wurden. War diese Uneinheitlichkeit des Zellbildes in den unteren Konzentrationen nur angedeutet, so war sie ab 1000 µg/ml (0,1 %) Acti-dione im Nährboden schon sehr ausgeprägt und nahm mit steigender Konzentration noch zu (vergl. Abb. 11).

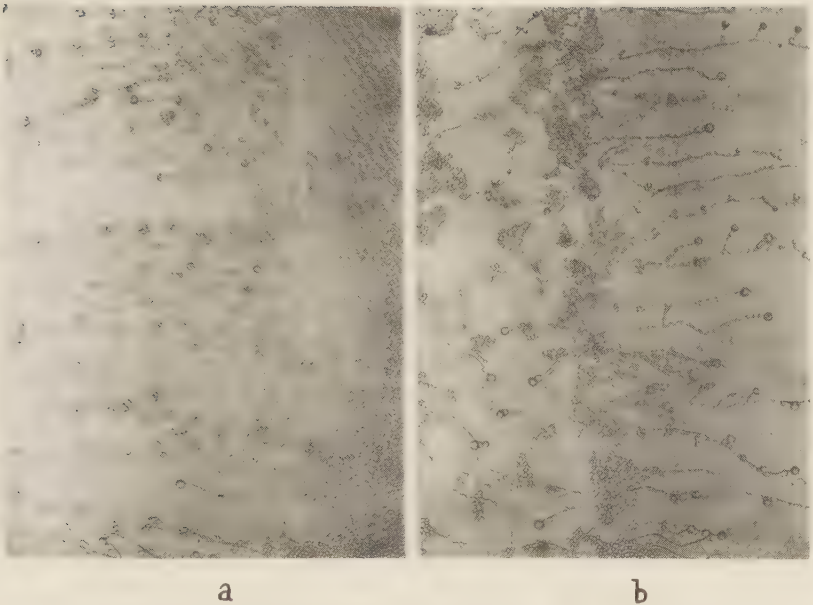


Abb. 11 : Beeinflussung der Blastosporen, der Pseudomycelbildung und des Chlamydosporenwachstums durch Acti-dione bei *Candida albicans*.

Reisagarkultur ohne Zusatz, 3 Tage bei 28°C, etwa 40-fach : a) Kontrolle, b) - f) nach vorherigem Wachstum auf Kimmig-Agar mit Zusatz von 10; 100; 1000; 2000 und 4000 µg/ml (0,001; 0,01; 0,1; 0,2; 0,4 %) Acti-dione im Nährboden. Beachte auch die zunehmende Uneinheitlichkeit des Zellbildes !

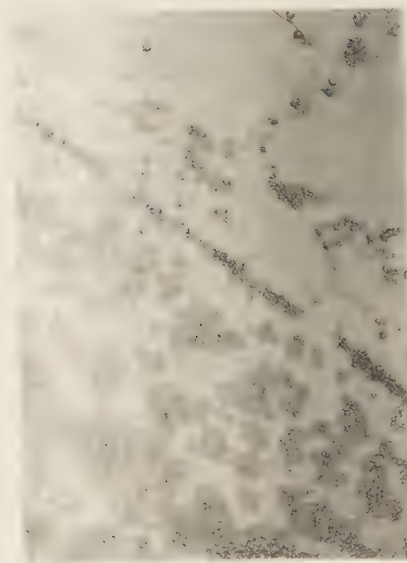
Abb. c, d, e, f siehe folgende Seite !



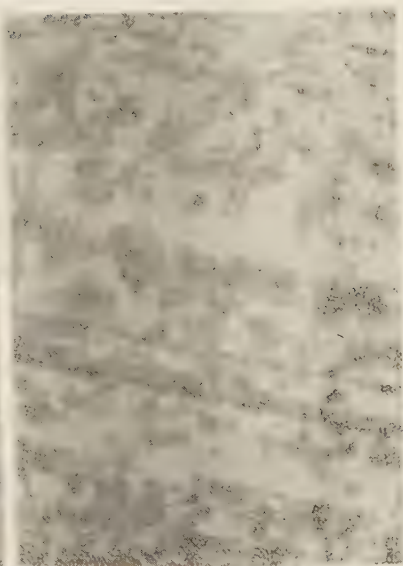
c



d



e



f

Abb. 11 : c) - f)

Text siehe vorhergehende Seite !

Mit zunehmender Acti-dionekonzentration waren auch vermehrt große, vakuolige Zellen zu erkennen, die in der Mitte des Z-förmigen Überimpfungsstriches zahlreich waren und zum Rande des Striches abnahmen. Unter mikroskopischer Betrachtung mit Oelimmersion (ca. 1000-fache Vergrößerung) konnte man deutlich erkennen, daß diese Zellen 2 - 3-fach größer als normale Blastosporen, außen doppelt konturiert und innen strukturlos waren, wobei ein Zellkern nicht mehr zu finden war. Das ganze Bild erinnerte an eine großvakuoläre Degeneration der Blastosporen. Vor allem bei 4000 µg/ml (0,4 %) gab es aber auch Stellen unter dem Mikroskop, die keine einzelnen Zellen mehr erkennen ließen, sondern nur noch eine amorphe Masse darstellten, die wie ein Zelltrümmerhaufen aussah und durch degenerierte und nekrotische Zellen gebildet wurde.

Die oben beschriebene Polymorphie nahm von innen nach außen ab. Mit längerer Beobachtungsdauer (nach 10 bis 14 Tagen) wurde das Zellbild am Rande des Überimpfungsstriches der Kontrollkultur gleicher, da am Rande neue, ungeschädigte Blastosporen gewachsen waren, während in der Mitte des Überimpfungsstriches die Vielfältigkeit des Zellbildes auch nach 14 Tagen deutlich erhalten blieb und es zu keiner Regeneration der geschädigten Zellen kam.

Obwohl sich *Candida albicans* als sehr widerstandsfähig gegenüber Acti-dione erwiesen hatte, wurde mikroskopisch die Pseudomycelbildung doch stärker als erwartet beeinflusst. Am zweiten und dritten Tag der Untersuchung zeigte sich noch, daß nach 10 µg/ml (0,001 %) keine erkennbare

Unterdrückung der Pseudomycelbildung vorhanden war; aber schon bei 100 µg/ml (0,01 %) und mehr noch bei 1000 µg/ml (0,1 %) zeigte sich bei den meisten Stämmen eine leichte Verminderung des Pseudomycels, die bei den höheren Konzentrationen von 2000 µg/ml (0,2 %) und 4000 µg/ml (0,4 %) mittel bis stark war. Aber auch hier fanden sich Ausnahmen: Bei 2 Stämmen trat sogar eine vermehrte Pseudomycelbildung auf; bei 4 Stämmen konnte man im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderung erkennen.

Mit steigender Konzentration wurde die Pseudomycelbildung aber nicht nur zunehmend verringert, sondern die einzelnen Pseudohyphen wurden auch gewundener und kürzer. Häufig wurde auch beobachtet, daß die Einzelzellen der Pseudohyphen durch Actidione dünner und länger wurden. Bei den höchsten Konzentrationen zeigten auch sie zum Teil degenerative Veränderungen.

Auch die Chlamydosporenbildung war mit steigender Abhängigkeit von der Actidionkonzentration bei 48 Stämmen verringert. Am zweiten Tag der mikroskopischen Untersuchung war ab 100 µg/ml (0,01 %) Actidione im Nährboden eine leichte Verminderung der Chlamydosporen zu erkennen. Bei 1000 µg/ml (0,1 %) war die Verringerung der Chlamydosporen leicht bis mittel, bei 2000 µg/ml (0,2 %) mittel und bei 4000 µg/ml (0,4 %) mittel bis stark. Siehe dazu auch Abb. 11 !

Während in den unteren Konzentrationen Form und Größe der Chlamydosporen nicht verändert wurde, waren bei 2000 µg/ml (0,2 %) und deutlicher bei 4000 µg/ml (0,4 %) doch mehr ovale, unreif wirkende Formen der Chlamydosporen zu beobachten.

Auch hier fand sich eine Ausnahme : In 1 Falle wurde eine gegenüber der Kontrolle erheblich stärkere Chlamydosporenbildung beobachtet. 3 Stämme zeigten im Vergleich zur Kontrolle unbeeinflusste Chlamydosporenbildung.

Bei 34 Stämmen (mehr als die Hälfte) kam es aber während der 14-tägigen mikroskopischen Untersuchung, mit dem dritten bis fünften Tag beginnend, auch bei den höheren Konzentrationen zu einer nachträglichen Steigerung des Pseudomycelwachstums und der Chlamydosporenbildung und somit zu einer Angleichung an die Kontrolle. Trotzdem war aber auch dann noch bei 2000 µg/ml (0,2 %) und 4000 µg/ml (0,4 %) eine mehr oder weniger deutliche Verringerung des Pseudomycels und der Chlamydosporen vorhanden, während bei 100 µg/ml (0,01 %) und niedriger keine Verringerung mehr zu erkennen war. Bei diesem Großteil der Stämme kam es in den ersten Tagen der Untersuchung also auch zu einer Verzögerung des Wachstums um 3 - 4 Tage. Ein Unterschied in der Stärke der Beeinflussung durch Acti-dione zwischen Chlamydosporenbildung und Pseudomycelwachstum war hier nicht zu beobachten.

3.3.2.2. Übrige Candida-Arten

Bereits einen Tag nach Abimpfung von den acti-dionehaltigen Nährböden war unter dem Mikroskop deutlich zu sehen, daß während des Wachstumsvorganges die Zellen durch Acti-dione deformiert waren und es auch hier wie bei *Candida albicans* zu einer Zellpolymorphie kam. Ebenso zeigten viele Blastosporen eine degenerative

Vakuolisierung; bei mehreren Zellen kam es auch zu einer weitgehenden Zerstörung des Zellbildes durch Wandschädigung, da deren Konturen unscharf wurden.

Die Zahl der degenerativ veränderten Zellen und die Zellpolymorphie nahm auch hier während des 14-tägigen Beobachtungszeitraumes durch neu hinzugewachsene Zellen zum Rande des Z-förmigen Überimpfungsstriches hin ab, wo das Zellbild der Kontrolle wieder ähnlicher wurde. Vergleicht man die einzelnen Acti-dionekonzentrationsstufen untereinander, so ergibt sich auch hier das bereits bei *Candida albicans* Gesagte, daß niedrige Konzentrationsstufen lediglich eine verhältnismäßig geringe Schädigung bewirken, während höhere Konzentrationen zu erheblichen Zellmißbildungen, Verkümmierungen und Verformungen der wachsenden Zellen führen.

Bemerkenswert ist die Beeinflussung der Pseudomycelbildung bei *Candida species*, da nur bei 4 Stämmen, nämlich bei je 2 Stämmen von *Candida tropicalis* und *Candida parapsilosis*, die erwartete, in Abhängigkeit von der Konzentration mehr oder weniger ausgeprägte Verminderung der Pseudomycelbildung zu beobachten war. Unabhängig von der Art war bei 9 Stämmen keine Verminderung der Pseudomycelbildung im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. Bei der Mehrheit von 25 Stämmen kam es dagegen nach Acti-dioneeinwirkung zu einer leichten bis mittleren, bei 3 Stämmen (*Candida parapsilosis*) sogar starken Vermehrung der Pseudomycelbildung. Dieses überraschende Ergebnis ist durch die Abbildung 12 dokumentiert.

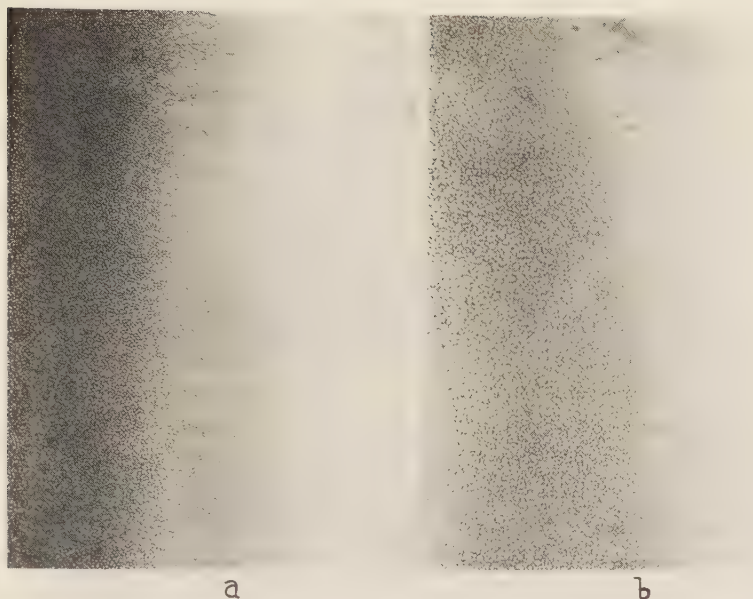


Abb. 12 : Beeinflussung der Blastosporen und der Pseudomycelbildung durch Acti-dione bei *Candida* species (hier *Candida parapsilosis*) auf Reis-agarkultur ohne Zusatz, 4 Tage alt bei 28°C, etwa 40-fach :

a) Kontrolle ohne Zusatz; b) nach vorherigem Wachstum auf Kimmig-Agar mit Zusatz von 10 µg/ml (0,001 %) Acti-dione im Nährboden. Beachte die Veränderung des Zellbildes und die deutliche Vermehrung des Pseudomycels !

Obwohl es während des 14-tägigen Beobachtungszeitraumes allgemein zu einer Angleichung zwischen Kontroll- und Testkultur kam, waren auch dann noch Unterschiede zwischen Kontrollbild und acti-dionegeschädigten Kul-

turen vorhanden.

An den Blastosporen des Pseudomycels bzw. den Pseudohyphen waren nur geringfügige Veränderungen durch Actidione zu beobachten. Vereinzelt kam es bei diesen (niedrigen) Konzentrationen zu einer Degeneration der Zellen; häufig waren aber Verformungen der Einzelzellen und Pseudohyphen zu sehen, die dann kürzer wirkten. Eine zeitliche Verzögerung im Auftreten der Pseudohyphen konnte im Vergleich zur Kontrolle nicht beobachtet werden.

3.3.2.3. Trichosporon species

Die relativ großen Blastosporen dieser Gattung wurden im Vergleich mit der Kontrollkultur durch Actidione nicht stark geschädigt. Da es auch bei den höheren Actidionkonzentrationen nur zu einer geringen Zellmißbildung mit Verkümmern und Verformung der wachsenden Zellen kam, bot sich unter dem Mikroskop keine ausgeprägte Polymorphie des Zellbildes nach Einwirkung von Actidione. Trotzdem traten auch hier pathologische Zellformen mit steigender Actidionkonzentration häufiger auf. Auch vakuoläre Degenerationen, die von der jeweils einwirkenden Actidionkonzentration abhängig waren, traten bei dieser Gattung nicht so oft auf wie bei den Candida-Stämmen. Die Zelldegenerationen waren in der Mitte des Überimpfungsstriches deutlicher als am Rande zu erkennen. Dort und im Laufe der 14-tägigen Untersuchungsdauer allgemein kam es zu einer steigenden Angleichung an das Kontrollbild, wenn auch in der Mitte des Überimpfungsstriches eine geringe Zellpolymorphie erhalten blieb.

Auch die Bildung der Hyphen bzw. des Mycels sowie die Septierung und der Zerfall in Arthrosporen unterlag einer Beeinflussung durch den Acti-dionegehalt des Nährbodens. Siehe dazu Abbildung 13 ! Vor allem am zweiten und dritten Tag der mikroskopischen Auswertung war bei der maximalen nicht total hemmenden Konzentration eine verminderte Mycelbildung, eine reduzierte Septierung und ein verspätetes sowie verminder-tes Auftreten von fertigen Arthrosporen zu beobachten. Diese reduzierte Arthrosporenbildung nach Acti-dioneinwirkung war bei *Trichosporon cutaneum* deutlicher als bei *Trichosporon capitatum* und wurde mit abnehmender Acti-dionekonzentration im Nährboden undeutlicher.

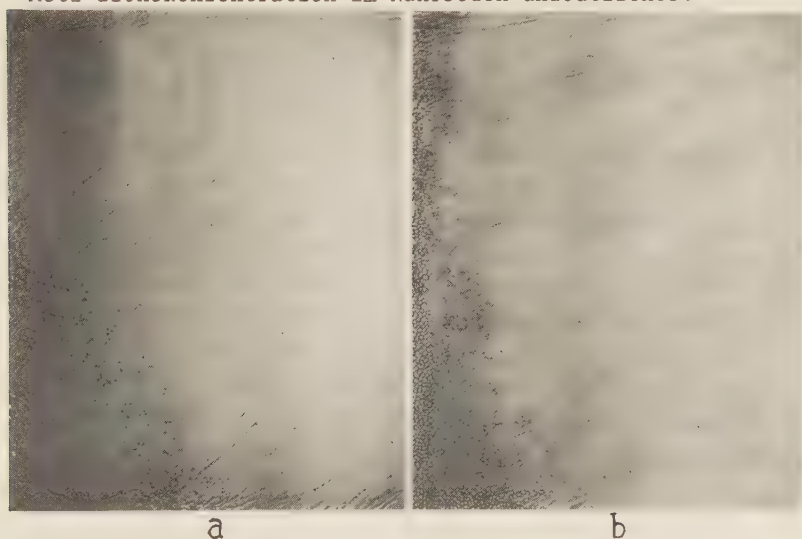


Abb. 13 : Beeinflussung des Mycels bzw. der Arthrosporen-
bildung bei *Trichosporon capitatum* durch
Acti-dione nach Überimpfung von Kimmig-Agar
auf Reisagar ohne Zusatz. Zwei Tage bei 28°C;
etwa 40-fach :
a) Kontrolle. b) Nach Wachstum auf 100 µg/ml
(0,01 %) Acti-dione im Nährboden. Näheres
siehe Text !

Bis zum siebten Tage der Untersuchungen kam es dann zu einer weitgehenden Angleichung an die Kontrolle, so daß am 14. Tag der Auswertung Kontrollbild und Acti-dionereihe an der Menge des Mycels und der Zahl der Arthrosporen nicht mehr zu unterscheiden waren. Pathologische Veränderungen oder Deformierungen wurden an den Hyphen bzw. Arthrosporen nicht beobachtet, obwohl nach Acti-dioneeinwirkung die Hyphen kürzer und die Arthrosporen weniger dick zu sein schienen.

4. B E S P R E C H U N G U N D B E U R T E I L U N G D E R U N T E R S U C H U N G S E R G E B N I S S E

Die in der Literatur für die mykologische Laboratoriums-
praxis empfohlenen Angaben sind nur Vorschläge, um eine
möglichst hohe Ausbeute an pathogenen Keimen aus dem
täglich anfallenden Untersuchungsmaterial zu bekommen
und sagen nur wenig über die Wirkung von Kaliumtellurit
und Acti-dione auf die imperfekten Hefen aus. Da außer-
dem die bisher veröffentlichten Arbeiten meist nur einen
engen Konzentrationsbereich und eine begrenzte Zahl von
Hefearten untersuchten, ergaben sich für den Interessier-
ten oft nur unzureichende Vergleichsmöglichkeiten hin-
sichtlich der Wirkung von Kaliumtellurit bzw. Acti-
dione auf imperfekte Hefen, zumal die Untersuchungen auch
meist noch auf verschiedenen Nährböden gemacht wurden.

Im Hinblick darauf und um Zufallsbefunde auszuschalten,
stellten wir uns mit dieser Arbeit die Aufgabe, eine
umfassendere Zahl von imperfekten Hefepilzen in einer
weiterreichenden Konzentrationsreihe von Kaliumtellurit
und Acti-dione als bisher veröffentlicht zu untersu-
chen. Um praxisnahe Ergebnisse und gute Vergleichs-
möglichkeiten zu erzielen, arbeiteten wir mit den Nähr-
böden und den technischen Methoden, die heutzutage auch
in modernen mykologischen Laboratorien angewandt werden.
Wir glaubten, daß dadurch auch die bis heute unterschied-
lich beantwortete Frage am besten geklärt werden konnte,
wieweit Sproßpilze in ihrem Wachstum einer Beeinflus-
sung durch Kaliumtellurit und Acti-dione unterliegen.
Im Gegensatz zur totalen Hemmkonzentration in anderen
Arbeiten legten wir unser Hauptaugenmerk auf die maxi-

male nicht total hemmende Konzentration, da hier die stärksten Einflüsse der beiden Testsubstanzen auf die imperfekten Hefen zu erwarten waren. Andererseits ermöglichte es uns gerade diese Grenzkonzentration, im Vergleich mit den in der mykologischen Routine verwendeten Konzentrationen für die Praxis brauchbare Erkenntnisse zu ziehen.

Es wurden 187 imperfekte Hefestämme auf jeweils 5 Konzentrationsstufen der beiden Testsubstanzen untersucht.

Insbesondere soll auf folgende Punkte näher eingegangen werden :

1. Von besonderem Interesse ist die Frage, ob die in der mykologischen Routinepraxis verwendeten Konzentrationen das Wachstum der Hefepilze total unterdrücken können.
2. Weiter steht die Frage im Vordergrund, ob es bei der Reisagaruntersuchung nach der Beeinflussung durch Kaliumtellurit und Acti-dione zu Fehlern in der mykologischen Diagnostik kommen kann.
3. Es soll die Frage beantwortet werden, ob die beiden Testsubstanzen Veränderungen an den imperfekten Hefen hervorrufen, die als taxonomische Merkmale zur schnelleren Differenzierung beitragen können.

Die untersuchten Hefen verhielten sich sehr unterschiedlich in ihrer Beeinflussung durch Kaliumtellurit oder Acti-dione. Bei der Kaliumtellurit-Testung lagen aber die maximalen nicht total hemmenden Konzentrationen für

die einzelnen Arten und Gattungen nicht so auffallend verschieden hoch wie bei der Acti-dione-Testung. Auch wir konnten die Mitteilung von HAUFE (46) und NICKERSON und Mitarbeitern (87) bestätigen, daß das Wachstum aller Sproßpilze in weitgehend quantitativer Abhängigkeit von der Kaliumtelluritkonzentration im Nährboden beeinflußt wird. Es zeigte sich auch, daß praktisch alle imperfekten Hefen einer Beeinflussung durch Kaliumtellurit unterliegen und die Fähigkeit haben, mehr oder weniger Tellurit zu metallischem Tellur zu reduzieren.

Während HAUFE (46) bei seinen Versuchen auf Maltoseagar mit 100 µg/ml (0,01 %) Kaliumtellurit keine auffallende Hemmung des Hefewachstums feststellte, zeigten bei unseren Untersuchungen auf Kimmig-Agar alle *Candida species*-Stämme (ohne *Candida albicans*) bereits eine deutliche Wachstumshemmung; die übrigen Arten wurden ebenfalls nur unbedeutend beeinflußt. Bei der Routinekonzentration von 300 µg/ml (0,03 %) hatte SCHÖNBORN (105) auf Malz-Peptonagar festgestellt, daß alle im dermatologischen Untersuchungsmaterial anfallenden Hefearten gegenüber Kaliumtellurit resistent waren und nur eine geringe Wachstumsverzögerung von 1 - 2 Tagen zeigten. Nach unseren Ergebnissen muß auf dieser Konzentration aber bei mehreren Pilzen wie *Candida species* (ohne *Candida albicans*), *Trichosporon species* und *Cryptococcus species* mit einer stärkeren Wachstumshemmung gerechnet werden; bei den *Candida*-Arten beobachteten wir auch eine wesentlich längere Wachstumsverzögerung von 2 - 4 Tagen.

In der Literatur fehlen bisher einheitliche Angaben, die die verschiedenen Arten bzw. Gattungen abgestuft

nach ihrer Empfindlichkeit oder Widerstandsfähigkeit gegenüber Kaliumtellurit vergleichen. Bei unserer Arbeit reagierte in Bezug auf die maximale nicht total hemmende Konzentration *Trichosporon species* am empfindlichsten von allen imperfekten Hefen; danach kamen in der Reihenfolge *Candida species* (ohne *Candida albicans*), *Cryptococcus neoformans*, *Torulopsis species* und *Candida albicans*. Am widerstandsfähigsten war *Rhodotorula species*, wobei *Rhodotorula rubra* und *mucilaginososa* am unempfindlichsten von allen untersuchten Arten waren. Man muß jedoch bedenken, daß einzelne Stämme ein von dieser Regel abweichendes Verhalten zeigen können.

Für die mykologische Praxis von großer Bedeutung ist, daß durch die bisher verwendete Routinekonzentration von 300 µg/ml (0,03 %) keine Hefe total im Wachstum unterdrückt wurde, obwohl diese Konzentration für mehrere Stämme und Arten die maximale nicht total hemmende Konzentration war. Trotzdem ist es auch weiterhin gerechtfertigt, diese Konzentration im mykologischen Laboratorium zu verwenden, wenn man neben einer partiellen Wachstumshehmung auch die dabei auftretende Wachstumsverzögerung verschiedener Hefen beachtet.

Wie viele Autoren auf anderen Medien feststellten, zeigten auch bei unseren Untersuchungen auf Kimmig-Agar alle Stämme durch Reduzierung von Tellurit einen grauen bis schwarzen Farbton der Kultur. Bei einem Vergleich ergaben sich aber auffallende Unterschiede unter den Gattungen. Während *Cryptococcus neoformans* nur eine hell-graue Pigmentierung zeigte und damit am wenigsten Tellur bildete, nahm die Pigmentierung über

Trichosporon species (mittel-grau), Candida species und Torulopsis species (dunkel-grau bis schwarz) bei Rhodotorula species (braun-schwarz) den intensivsten Farbton an. Ein Nachteil für die mykologische Praxis ist dabei, daß der rote Farbton der Rhodotorula-Hefen verdeckt wird und diese Hefen so eventuell nicht mehr makroskopisch diagnostiziert werden können. Da die meisten Rhodotorula-Stämme auch auf den niedrigen Konzentrationen bereits intensiver als die übrigen Pilze durch abgelagertes Tellur pigmentiert waren, läßt sich diese Beobachtung nach unseren Ergebnissen nur zum Teil damit erklären, daß sie als widerstandsfähigste Hefen auf den hohen Kaliumtelluritkonzentrationen auch am meisten Tellur produzieren konnten. Vermutlich hat diese Gattung auch eine größere Potenz, Tellurit zu reduzieren, obgleich auch die Interferenz des natürlichen roten Pigments mit dem exogenen dunklen Tellur eine Rolle spielen dürfte. Während wir aber aus dieser unterschiedlichen Verfärbung keine taxonomischen Rückschlüsse ziehen, sind wir doch mit SCHÖNBORN (105) einer Meinung, daß Mischkulturen dadurch eventuell erkannt werden können.

Der helle, von der Pigmentierung ausgenommene Randsaum war im Gegensatz zu HAUFE (46) wie bei SCHÖNBORN (105) nicht bei allen Hefen zu beobachten. Nach unseren Befunden ist dieser Randsaum bei den niedrigen Konzentrationen besonders stark ausgeprägt und wird mit steigender Konzentration schwächer. Da er bei der Routinekonzentration unabhängig von der Gattung nur noch an vereinzelter Stämmen nachweisbar war, kann dieses Merkmal in der Praxis diagnostisch nicht verwendet werden.

Dieser Saum konnte bei *Trichosporon* nicht nachgewiesen werden und trat praktisch vollständig nur bei *Candida*, *Rhodotorula* sowie *Cryptococcus* auf; bei *Torulopsis* war er nur an einem großen Teil der Stämme zu sehen. Entsprechende Mitteilungen fehlen in der Literatur bis jetzt. Nach unserer Ansicht handelt es sich dabei um nicht pigmentierte Wuchsformen der Hefen und zum anderen um neue, nur wenig Tellur enthaltende und vereinzelt vakuolisierte Zellverbände, die mit steigendem Telluritgehalt im Nährboden ebenfalls reduziertes Tellur intracellulär lagern.

Bei Subkultur auf telluritfreiem Kimmig-Agar-Nährmedium hatte nur *Candida albicans* eine geringe Wachstums-erholung nach der Schädigung durch Kaliumtellurit gezeigt. Man kann daraus schließen, daß mit steigender Konzentration die Beeinflussung durch Kaliumtellurit irreversibler wird, zumal bei den niedrigen Konzentrationen eine deutlichere Wachstumszunahme zu beobachten war. Trotzdem muß der Aussage von SCHÖNBORN (105) beigestimmt werden, daß Hefezellen mit hochgradiger Tellur-ablagerung ihre Teilungsfähigkeit nicht verlieren müssen, da auch bei unseren Subkulturen ein Teil des Pigments an die Tochterzellen weitergegeben wurde und auf dem telluritfreien Medium eine Pigmentierung erhalten blieb.

Bei der mikroskopischen Untersuchung bekamen wir zum Teil andere Ergebnisse als SCHÖNBORN (105), die keine graduellen Unterschiede im Tellurspeichervermögen einzelner Zellen bemerkte, während sich bei uns ein interessanter Unterschied in der Tellurablagerung zwischen *Trichosporon* und *Candida* ergab (Allerdings müssen wir

noch einmal betonen, daß wir die mikroskopischen Untersuchungen auf der Reisagarkultur ohne Zusatz nach Abimpfung von tellurithaltigem Kimmig-Agar machten). Im Gegensatz zu den Candida-Arten, wo wie bei SCHÖNBORN (105) die Tellurablagerung und damit graue bis schwarze Pigmentierung des Überimpfungsstriches fast einheitlich stark war und zum Rande hin durch neu hinzuge wachsene Zellen kontinuierlich abnahm, sahen wir bei Trichosporon auch in der Mitte der Kultur eine fleckförmige und uneinheitlich verteilte Tellurablagerung durch gleichzeitiges Vorhandensein schwarz pigmentierter Zellen und solcher, die nur wenig Tellurkörnchen aufwiesen. Ähnliches hatte auch STAIB (113) bei Trichosporon cutaneum beobachtet.

Da ein Abstrich von tellurlosen Zellhaufen auf Tellurit-Kimmig-Agar jedoch normales Verhalten, d.h. Pigmentierung der Zellen ergab, mußten wir die Vermutung, es seien Zellen ohne Reduktionsvermögen, wieder fallen lassen. Offensichtlich bekamen mehrere Tochterzellen bei der Teilung kein Tellur von der Mutterzelle und bildeten dann Zellhaufen ohne Tellurgehalt. Ebenso ist auch die unterschiedliche Tellurablagerung, die vereinzelt bei Candida am Rande der Kultur auftrat, dadurch zu erklären, daß Tochterzellen mehr oder weniger Tellur bei der Sprossung erhielten.

Da kein Autor so hohe Konzentrationen wie wir untersuchte, fehlten bisher auch Aussagen darüber, wieweit die Sproßpilze durch Kaliumtellurit zellulär geschädigt werden. Wir konnten mit steigender Konzentration im Nährboden eine zunehmende Polymorphie und degenerative

Veränderung vieler Zellen beobachten. Diese Zellschädigung war auffallenderweise bei Trichosporon wesentlich geringer ausgeprägt als bei Candida. Dies ist aber nur zum Teil damit zu erklären, daß Trichosporon bereits in niedrigeren Konzentrationen gehemmt wurde und so die Wirkung von Kaliumtellurit bei den hohen Konzentrationen nicht mehr vergleichend beobachtet werden konnte, da auch bei den unteren Konzentrationen schon gewisse quantitative Unterschiede bestanden. Sicherlich spielt dabei auch die Beobachtung eine Rolle, daß Trichosporon weniger stark pigmentiert wurde, also vermutlich weniger Tellur reduzieren konnte.

HAUFE (46), NICKERSON und Mitarbeiter (87), SCHÖNBORN (105) sowie andere Autoren hatten festgestellt, daß durch Kaliumtellurit die Mycelphase der Sproßpilze zu Gunsten der Hefephase zurückgedrängt wurde. Wir erzielten bei Trichosporon und dem Großteil der Candida-Arten adäquate Ergebnisse. Bemerkenswert ist aber, daß die Unterdrückung der typischen Wuchsformen bei Trichosporon geringer als bei den Candida-Stämmen war und über den gesamten Beobachtungszeitraum von 14 Tagen weitgehend erhalten blieb. Letzteres bewies uns, daß die Beeinflussung der Sproßpilze durch Kaliumtellurit nach Überimpfung auf Reisagar ohne Zusatz weiter erhalten blieb und sich die Testpilze auf dem nährstoffarmen Reisagar nicht regenerieren konnten, obwohl gerade dieser Agar die Ausbildung der typischen Wuchsformen fördert. Im Gegensatz zu anderen Autoren hatte KAFFKA (56) auf einem tellurithaltigen Serumnährboden beobachtet, daß Candida albicans sich besonders da durch seine typischen Wuchsformen (Pseudomycel und Chlamydosporen) aus-

zeichnete. Auch wir beobachteten bei 7 *Candida albicans*-Stämmen nach den niedrigen Kaliumtelluritkonzentrationen eine Steigerung der Pseudomycelbildung. Besonders überraschend war unser Ergebnis bei 23 von 38 *Candida*-Stämmen (ohne *Candida albicans*), die in den ersten Tagen der Untersuchung ebenfalls eine Vermehrung der Pseudomycelbildung zeigten. Es ist vorstellbar, daß bei diesen Stämmen die Beeinflussung durch Kaliumtellurit auf dem Reisagar ohne Zusatz aufhörte und die Ausbildung der typischen Wuchsformen in dem nährstoffarmen und halbanaeroben Milieu zum Zuge kam. Eine weitere Erklärung lieferte KAFFKA (56) dadurch, daß er eine Hemmung der Zellteilung durch Tellur postulierte, während andere Autoren wie NICKERSON und Mitarbeiter (87) gerade das Gegenteil annahmen.

Allgemein waren auch bei uns die beschriebenen Veränderungen in quantitativer Abhängigkeit von der Konzentration des Kaliumtellurits im Nährboden, wobei aber das Verhalten der Pilzstämme einer Art nicht immer einheitlich ist, da vereinzelte Hefen ein abweichendes Verhalten gezeigt hatten.

An Hand unserer Ergebnisse muß während der Arbeit im mykologischen Labor nur bei einigen *Candida*-Stämmen (ohne *Candida albicans*) damit gerechnet werden, daß nach Abimpfung von der Kaliumtellurit-Routinekonzentration (300 µg/ml bzw. 0,03 % im Kimmig-Agar) die Ausbildung des Pseudomycels auf Reisagar bereits soweit unterdrückt ist, daß es zu Fehlern in der Diagnostik führen kann. Bei allen übrigen Sproßpilzen besteht nach unserer Meinung diese Gefahr nicht. Trotzdem sollten die mikroskopisch-diagnostischen Untersuchungen

auf Reisagar immer vergleichend von den üblichen Parallelkulturen (-eine mit antibakteriellem Zusatz wie Kaliumtellurit, die andere mit antimykotischem Zusatz wie Acti-dione-) gemacht werden, um auch diese seltene, aber mögliche Fehlerquelle auszuschließen.

Von größerer Bedeutung als die Kaliumtellurit-Testung ist für den mykologisch Arbeitenden aber die Untersuchung des Acti-dione, da es heutzutage in mykologischen Laboratorien häufiger verwendet wird. Bei Acti-dione lagen die maximalen nicht total hemmenden Konzentrationen für die einzelnen Hefearten und -gattungen wesentlich unterschiedlicher und weiter auseinander als bei Kaliumtellurit. Trotzdem konnten wir mit unseren Untersuchungen auch hier die allgemeinen Feststellungen verschiedener Arbeiten in der Fachliteratur bestätigen, daß praktisch alle imperfekten Hefen einer Beeinflussung durch Acti-dione unterliegen und daß die Wachstumsbeeinflussungen in weitgehend quantitativer Abhängigkeit von der Konzentration des Antimykotikums im Nährboden stehen. Zum Teil werden diese Beeinflussungen aber erst in sehr hohen, nur theoretisch interessanten Konzentrationen deutlich.

Viele Autoren wie WHIFFEN (131), GEMEINHARDT (31), KIELSTEIN (61), VERONA und PICCI (126) sowie ADAM und STEITZ (1) hatten bei ihren Untersuchungen festgestellt, daß *Candida albicans* gegenüber Acti-dione sehr widerstandsfähig war, und gaben Konzentrationen von über 500 µg/ml (0,05 %) bzw. 1000 µg/ml (0,1 %) an, bei denen man mit Wachstumsbeeinflussungen rechnen müßte. Da wir aber noch wesentlich höhere Konzentrationen als die übrigen Autoren untersuchten und selbst bei

4000 µg/ml (0,4 %) nur stärkere partielle Wachstums-
hemmungen fanden, konnten wir die Richtigkeit dieser
Angaben feststellen, auch wenn vereinzelte *Candida*
albicans-Stämme schon bei niedrigeren Konzentrationen
Wachstumsbeeinflussungen durch Acti-dione zeigten.

Im auffallenden Gegensatz zu *Candida albicans* erweisen
sich die übrigen *Candida*-Arten als sehr empfindlich
gegenüber Acti-dione. Unsere Ergebnisse stehen dabei
teilweise im Gegensatz zu Veröffentlichungen anderer
Autoren. Während GEMEINHARDT (31) bei *Candida parapsi-*
losis erst ab 500 µg/ml (0,05 %) eine totale Wachstums-
hemmung feststellte, sahen wir schon wesentlich früher
bei 100 µg/ml (0,01 %) für 75 % unserer *Candida para-*
psilosis-Stämme eine totale Hemmung. Bei dieser rela-
tiv niedrigen Konzentration wuchs auch der Großteil
unserer *Candida tropicalis*- und *pseudotropicalis*-Stämme
nicht mehr. GEMEINHARDT (31) und KIELSTEIN (61) rechneten
dagegen erst bei Konzentrationen von über 500 µg/ml
(0,05 %) mit partieller Wachstums-
hemmung, während ADAM und STEITZ (1) uns ähnliche Ergebnisse erzielten.

Die von den meisten Autoren nicht berücksichtigten
Torulopsis-Hefen erwiesen sich in unserer Arbeit eben-
falls als relativ empfindlich gegenüber Acti-dione.
Eine annähernd gleiche Empfindlichkeit fanden VERONA
und PICCI (126) sowie ADAM und STEITZ (1). Da diese
Autoren aber nur eine Art bzw. wenige Stämme überprüften,
blieben uns bei dieser Gattung kaum Vergleichsmöglich-
keiten.

GEMEINHARDT (31) und KIELSTEIN (61) berichteten in
ihren Arbeiten, daß bei *Trichosporon cutaneum* und *capi-*

tatum in Konzentrationen über 500 µg/ml (0,05 %) mit einer partiellen Hemmung zu rechnen sei. Während auch wir bei *Trichosporon cutaneum* erst ab 1000 µg/ml (0,1 %) stärkere Wachstumsbeeinflussungen erlebten, reagierten bei unseren Versuchen die *Trichosporon capitatum*-Stämme wesentlich empfindlicher auf Acti-dione, da von 6 Stämmen bereits 4 bei der niedrigen Konzentration von 100 µg/ml (0,01 %) total im Wachstum gehemmt wurden. Auch ADAM und STEITZ (1) fanden bei *Trichosporon* eine stärkere Empfindlichkeit als GEMEINHARDT (31) und KIELSTEIN (61); allerdings differenzierten sie nicht zwischen den beiden Arten.

Cryptococcus neoformans wurde wie in früheren Veröffentlichungen auch bei uns bereits in den niedrigsten Testkonzentrationen total gehemmt. Allerdings fehlen bei anderen Untersuchern Angaben über die Beeinflussung der von diesem Pilz produzierten Hefestärke, die bei unserer Untersuchung - wenn überhaupt - nur sehr unbedeutend durch Acti-dione gehemmt wurde.

Vermutlich wegen ihrer geringen pathogenen Bedeutung wurden die *Rhodotorula*-Hefen bisher nur von wenigen Autoren auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Acti-dione untersucht. In unserer Arbeit erwies sich diese Gattung insgesamt als sehr empfindlich. VERONA und PICCI (126) sahen bei *Rhodotorula glutinis* aber eine noch größere Empfindlichkeit als wir. ADAM und STEITZ (1) fanden bei ihrer allerdings nur geringen Zahl von roten Hefen ähnliche Ergebnisse wie wir. Die von uns beobachtete und nirgends beschriebene Farbänderung durch Acti-dione bei *Rhodotorula* ging nicht soweit, daß diese Hefen durch ihre heller werdende Pigmentierung in der Routinediagnostik

nicht mehr erkannt oder mit anderen Hefepilzen verwechselt werden können.

Wie schon erwähnt, sind die Ursachen für die divergierenden Befunde nach unserer Meinung darin zu suchen, daß sie mit verschiedenen Methoden gewonnen wurden. Daher fehlen auch Vergleiche über graduelle Unterschiede in der Empfindlichkeit der imperfekten Hefen gegenüber Acti-dione. Bisher war aus der Literatur nur zu ersehen, daß *Candida albicans* der widerstandsfähigste und *Cryptococcus neoformans* der empfindlichste Pilz ist. Dieses Ergebnis traf auch bei uns zu. Im Hinblick auf die maximale nicht total hemmende Konzentration, die uns hierbei einen guten Parameter lieferte, folgten auf *Cryptococcus neoformans* mit abnehmender Empfindlichkeit und zunehmender Widerstandsfähigkeit *Rhodotorula species* sowie *Torulopsis famata*, *glabrata*, *inconspicua*, *gropengiesseri*, *utilis* und *Candida pseudotropicalis*, *parapsilosis* und *krusei*. Danach kamen *Trichosporon capitatum* und *pullulans*, die übrigen *Candida*-Arten (ohne *Candida albicans*), mit Einschränkungen noch *Rhodotorula mucilaginosa*, die restlichen *Torulopsis*-Arten (u.a. sake), *Trichosporon cutaneum* und *fermentans* sowie der mit Abstand widerstandsfähigste Hefepilz *Candida albicans*.

Zusammenfassend muß aber auch erwähnt werden, daß nach unseren Beobachtungen das Verhalten der einzelnen Pilzstämme innerhalb der gleichen Art und Gattung nicht einheitlich ist, sondern es auch mehrere Ausnahmen gibt. Am eindrucksvollsten war diese Beobachtung bei *Candida parapsilosis* zu machen, am wenigsten in unserem Material bei *Rhodotorula mucilaginosa*.

Die makroskopischen Veränderungen der Pilzoberflächen durch Acti-dione wurden bisher nur von ADAM und STEITZ (1) besonders für *Trichosporon* genauer beschrieben. Wir hatten bei unseren Versuchen durch die Anwendung höherer Konzentrationen den Vorteil, auch bei anderen Arten deutliche Veränderungen an den Oberflächen der Kulturen zu beobachten, die mit zunehmender Acti-dionekonzentration im Nährboden ausgeprägter wurden. Auch wir sahen bei *Trichosporon* die stärksten makroskopischen Veränderungen : die sonst stark gewundenen und vorgewölbten Oberflächen erschienen flacher, glatter und cremiger; im Gegensatz dazu waren bei *Candida albicans* die Oberflächen aber nur gering verändert. Auffallend war dabei, daß mit steigender Acti-dionekonzentration alle Stämme (außer *Rhodotorula*) einen gelblichen Farbton bekamen. Genauso wie die früher erwähnte Farbänderung bei *Rhodotorula* dürften diese Erscheinungen auf die direkten degenerativen Veränderungen der Zellen und die Unterdrückung bestimmter Wuchsformen zurückzuführen sein.

Schon ADAM und STEITZ (1) hatten beobachtet, daß bei 500 µg/ml (0,05 %) Acti-dione im Nährboden ein Großteil der imperfekten Hefen - mit Ausnahme von *Candida albicans* - weitgehend unterdrückt und dadurch dem Nachweis entzogen werden konnte. Die beiden Autoren schlugen deshalb zur Verwendung in der mykologischen Praxis nur 300 µg/ml (0,03 %) Acti-dione im Nährboden vor. Ähnliche Bedenken müssen auch wir hinsichtlich der in unserem Labor verwendeten Konzentration von 500 µg/ml (0,05 %) erheben, zumal die Hefepilze immer mehr an pathogener Bedeutung gewinnen. Keine Gefahr für eine so starke

Unterdrückung sehen wir bei dem allerdings bedeutendsten pathogenen Pilz *Candida albicans* und bei *Torulopsis sake*; mit Einschränkung auch bei *Trichosporon cutaneum* und *Rhodotorula mucilaginosa*. Bei allen übrigen Arten kamen mehr oder weniger viele Stämme vor, die bereits in wesentlich niedrigeren Konzentrationen total gehemmt wurden. Dies betrifft besonders *Candida species* (ohne *Candida albicans*), *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon capitatum* und viele *Torulopsis*-Stämme, die dadurch in der Routine der Diagnostik entgehen würden. Auf Grund unserer Untersuchungen glauben wir aber nicht, daß durch eine niedrigere Routinekonzentration von 300 µg/ml (0,03 %) bessere diagnostische Ergebnisse erreicht werden können, da einerseits auch dadurch noch die meisten der bei 500 µg/ml (0,05 %) unterdrückten Hefen im Wachstum gehemmt blieben und andererseits an Hand der Literatur eine Konzentration von 500 µg/ml (0,05 %) besonders hinsichtlich der erwünschten Unterdrückung der Schimmelpilze benötigt wird. Eine noch größere Herabsetzung der Routinekonzentration mit dem Ziel einer breiten Erfassung der Hefepilze verbietet sich daher von selbst, zumal auch den dadurch diagnostizierbaren Hefen nur eine geringe pathogene Bedeutung zukommen dürfte. In unserem Labor wird aber der Vorschlag von ADAM und STEITZ (1) praktiziert, grundsätzlich mit dem Untersuchungsmaterial zwei Parallelkulturen zu beimpfen, von denen die eine ein gegen Bakterien gerichtetes Antibiotikum, die andere aber einen Acti-dionezusatz erhalten sollte, und darauf die weitere Diagnostik aufzubauen. Nach unserer Ansicht bietet dieses Vorgehen eine weitgehend sichere Gewähr, den Nachteil bei der Verwendung von Acti-dione auszugleichen. Auch die durch

die Routinekonzentration bei vielen Hefen verursachten partiellen Wachstumshemmungen stellen keine Schwierigkeit für die Laboratoriumsarbeit dar, da sich alle Stämme nach Subkultur von acti-dionehaltigem Nährboden auf Kimmig-Agar ohne Zusatz wieder erholen und nahezu unverändert wachsen, was die von SOSKOVA und Mitarbeitern (112) als cytostatisch beschriebene Wirkung des Acti-dione beweisen würde.

In den meisten Mitteilungen über die Wirkung von Acti-dione auf imperfekte Hefen fehlen nähere Untersuchungen über die mikroskopischen Veränderungen, um unsere Untersuchungsergebnisse damit vergleichen zu können. Da wir auch bei der Acti-dioneuntersuchung mit unseren Testkonzentrationen wesentlich weiter als die übrigen Autoren gingen, fanden wir besonders bei den höheren Konzentrationen eine ausgeprägte Polymorphie und deutliche degenerative Schädigung von Blastosporen. Wie bei Kaliumtellurit waren diese Schädigungen durch Acti-dione bei *Candida* stärker als bei *Trichosporon* ausgebildet. Vermutlich sind die größeren Zellen der Gattung *Trichosporon* gegenüber Acti-dione weniger empfindlich. Diese Vielgestaltigkeit des Zellbildes und die degenerativen Veränderungen der Blastosporen nahmen besonders am Rande der Kultur während des 14-tägigen Beobachtungszeitraums durch neu hinzugewachsene Zellen ab, blieben aber bei der maximalen nicht total hemmenden Konzentration in der Mitte der Kultur deutlich erhalten. Auch dieser Befund zeigt, daß es im Laufe der Zeit bei den Sproßzellen zu einer teilweisen Regeneration kommt.

Das Verhalten der typischen Hefewuchsformen bei Wachs-

tum auf acti-dionehaltigem Nährboden war bisher nicht so häufig und ausführlich untersucht worden wie bei Kaliumtellurit, obwohl Autoren wie ADAM und STEITZ (1) und ADAM und SCHWANKL (2) eine Unterdrückung der Pseudomycelbildung bei *Candida* und der Arthrosporenentwicklung bei *Trichosporon* beschrieben. Bei der Diskussion unserer Ergebnisse mit denen von ADAM und STEITZ (1) müssen wir aber erneut einschränkend sagen, daß wir eine andere Untersuchungsmethode gewählt haben. Während ADAM und STEITZ (1) ihre mikroskopischen Befunde direkt auf einem acti-dionehaltigen Nährboden machten, arbeiteten wir auf Reissagar ohne Zusatz nach Abimpfung von einem acti-dionehaltigen Nährboden. Bei der überwiegenden Mehrheit von *Candida albicans* beobachteten auch wir im Gegensatz zur makroskopischen Resistenz besonders nach den hohen Konzentrationen eine deutliche Verminderung von Pseudomycel und Chlamydosporen. Bei einem Großteil der übrigen *Candida*-Arten bekamen wir aber unabhängig von der Art ein gegensätzliches Ergebnis mit einer allgemeinen Vermehrung der Pseudomycelbildung. Obwohl auch wir im Hinblick auf die Mitteilung von ADAM und STEITZ (1) und auf die bei *Candida albicans* besprochenen Befunde zunächst ein anderes Ergebnis, nämlich eine Verminderung der Pseudomycelbildung, erwartet haben, ist dieses Phänomen wenigstens teilweise erklärbar. Auch bei *Candida albicans* kam es nach Abimpfung von den niedrigen Konzentrationen bei einem Teil der Stämme zunächst zu einer Vermehrung des Pseudomycels, während eine deutliche Verminderung erst bei den hohen Konzentrationen auftrat. Da die übrigen *Candida*-Arten jedoch nur auf den niedrigen Acti-dionekonzentrationen gewachsen waren, ist diese zunächst so

überraschende Vermehrung verständlich, wenn man dieses unterschiedliche Verhalten von Arten innerhalb einer Gattung näher vergleicht.

Auch auf vergleichbaren Konzentrationsstufen war die Hemmung der Arthrosporenbildung bei *Trichosporon* geringer als die der *Candida*-Wuchsformen. ADAM und STEITZ (1) hatten bei ihren Untersuchungen nur noch vereinzelte Arthrosporen nachweisen können, differenzierten aber nicht zwischen den *Trichosporon*-Arten. Wir sahen bei *Trichosporon cutaneum* eine auffallendere Reduzierung der Arthrosporen als bei *Trichosporon capitatum*. Beide Arten verhielten sich damit anders als bei der makroskopischen Untersuchung.

Im Laufe der 14-tägigen Beobachtungszeit kam es aber besonders bei den niedrigen Konzentrationen zu einer nachträglichen Steigerung der Wuchsformen. Diese Angleichung an das Kontrollbild war nahezu vollständig bei *Trichosporon*, weniger bei *Candida*, wo nach der maximalen nicht total hemmenden Konzentration ein deutlicher Unterschied bestehen blieb. Diese Beobachtung zeigte uns einerseits, daß die Wirkung des Acti-dione bei den höheren Konzentrationen auch noch nach Abimpfung auf Reisagar ohne Zusatz erhalten blieb, und andererseits, daß diese Wirkung aber nicht irreversibel war, da sich die meisten Stämme zum Teil regenerieren konnten. Nach unseren Ergebnissen besteht also für die mykologische Praxis keine Gefahr, daß es bei der mikroskopischen Diagnostik der Kulturen, die vorher auf der Routinekonzentration von 500 µg/ml (0,05 %) Acti-dione gewachsen sind, im Rahmen der Reisagaruntersuchung zu Fehldiagnosen

durch Unterdrückung der typischen Wuchsformen kommen kann.

Die zahlreichen Vergleiche mit abgestuften Acti-dione-konzentrationen im Nährboden haben uns gezeigt, daß auch die mikroskopischen Beeinflussungen in einer quantitativen Abhängigkeit von der Konzentration des Antibiotikums im Nährboden stehen, da allgemein nach der maximalen nicht total hemmenden Konzentration die stärksten Schädigungen aufgetreten sind. Aber auch hier kam es wiederum bei einzelnen Stämmen zu einem abweichenden Verhalten innerhalb einer Gruppe, so daß es nicht gerechtfertigt wäre, nur aus dem Verhalten einzelner Stämme allgemeine Schlüsse zu ziehen.

In einer abschließenden Beurteilung rufen weder Kalium-tellurit noch Acti-dione makroskopische und mikroskopische Wirkungen an den imperfekten Hefen hervor, die als taxonomische Merkmale zu einer schnelleren Differenzierung und Identifizierung der Sproßpilze beitragen können.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Kaliumtellurit und Acti-dione werden häufig mykologischen Nährböden zur Vermeidung des kontaminierenden Wachstums von Bakterien und Schimmelpilzen zugesetzt. Auch Hefepilze werden in unterschiedlichem Grade durch diese Substanzen gehemmt. In der vorliegenden Arbeit sollte das Ausmaß der Wachstumshemmung von imperfekten Hefen durch Kaliumtellurit und Acti-dione untersucht werden, um zu ermitteln, ob durch diese Zusätze Fehler in der Hefediagnostik auftreten können.

Als Untersuchungsmedien dienten Kimmig-Testagar im Reihenverdünnungstest für die makroskopische Beurteilung und Reisagar ohne Zusatz für die sich anschließende mikroskopische Auswertung. Damit benutzten wir die Medien, die am häufigsten in der mykologischen Laboratoriums-Diagnostik verwendet werden. Es wurden insgesamt 187 imperfekte Hefestämme der Gattungen Candida (90 Stämme, davon 52 Candida albicans-Hefen), Torulopsis (38 Stämme), Trichosporon (20 Stämme), Cryptococcus (6 Stämme) und Rhodotorula (33 Stämme) geprüft.

Zunächst wurde in Reihenverdünnungstesten auf Kimmig-Agar die maximale nicht total hemmende Konzentration bzw. die minimale Hemmkonzentration für einzelne Hefearten und Gattungen sowie verschiedene Stämme innerhalb der einzelnen Arten festgestellt.

Die Kaliumtellurit-Empfindlichkeit wurde in einer Konzentrationsreihe von 50 µg/ml (0,005 %), 100 µg/ml (0,01 %), 300 µg/ml (0,03 %), 1000 µg/ml (0,1 %) und 2000 µg/ml (0,2 %) untersucht. Hierbei ergab sich, daß die maximale nicht total hemmende Konzentration in Abhängigkeit

von der Pilzart zwischen 300 µg/ml (0,03 %) und 2000 µg/ml (0,2 %) Kaliumtellurit im Nährboden lag. Das bedeutete, daß bei der üblicherweise verwendeten Konzentration von 300 µg/ml (0,03 %) keine Hefe total, allenfalls einige Arten nur partiell im Wachstum gehemmt wurden. Makroskopisch erwiesen sich *Rhodotorula*-Arten als Angehörige der widerstandsfähigsten Hefegattung. Die Hälfte aller Stämme zeigte auch bei der höchsten Testkonzentration von 2000 µg/ml (0,2 %) noch geringes Wachstum, wobei bei der üblichen Konzentration von 300 µg/ml (0,03 %) nur ein Stamm stark gehemmt wurde. Auch *Torulopsis species* erwies sich als relativ widerstandsfähig gegenüber Kaliumtellurit; nur 26 von 38 Stämmen waren bei 2000 µg/ml (0,2 %) total im Wachstum unterdrückt. Es folgten in der Empfindlichkeit die *Candida*-Arten, wobei *Candida albicans* etwas empfindlicher als die übrigen *Candida*-Hefen reagierte. Von den 38 *Candida species*-Stämmen (ohne *Candida albicans*) wurden bei der höchsten Konzentration von 2000 µg/ml (0,2 %) nur 31 Stämme total im Wachstum unterdrückt; 7 Stämme, darunter 5 Stämme der Art *Candida parapsilosis*, zeigten noch partielles Wachstum. Von den 52 *Candida albicans*-Stämmen wuchsen dagegen nur noch 2 Stämme bei dieser Konzentration. Noch empfindlicher zeigte sich *Cryptococcus neoformans*, von dem bei 2000 µg/ml kein Stamm mehr Wachstum aufwies. Am empfindlichsten von allen imperfekten Hefen reagierte *Trichosporon species*, da hier die maximale nicht total hemmende Konzentration bereits bei 300 µg/ml (0,03 %) war.

Auch die makroskopisch sichtbaren Veränderungen betrafen am deutlichsten die Oberfläche dieser letztgenannten Gattung. Die Kulturen wurden neben anderen Veränderungen

flacher und samtiger. Allgemein wurde mit steigender Konzentration die Farbe der Kolonien durch abgelagertes Tellur pigmentierter; am stärksten war die schwärzliche Verfärbung bei *Rhodotorula species*. Auffallend war die Bildung eines nicht pigmentierten, glasig-weißlichen Randsaums an den Kulturen, der mit steigender Konzentration abnahm und nur bei *Trichosporon species* nicht auftrat.

Die Acti-dione-Empfindlichkeit wurde ebenfalls in 5 Konzentrationsstufen, nämlich 10 µg/ml (0,001 %); 100 µg/ml (0,01 %); 1000 µg/ml (0,1 %); 2000 µg/ml (0,2 %) und 4000 µg/ml (0,4 %) getestet. Hier war die maximale nicht total hemmende Konzentration für die einzelnen Hefe-Arten innerhalb einer Gattung wesentlich unterschiedlicher als bei Kaliumtellurit. Am wenigsten wurde durch Acti-dione, im Unterschied zu den übrigen *Candida*-Arten, *Candida albicans* beeinflusst, da selbst bei der höchsten Konzentration von 4000 µg/ml (0,4 %) 50 von den 52 Stämmen nur partiell gehemmtes Wachstum zeigten. Als widerstandsfähig erwiesen sich auch noch *Torulopsis sake* und *stellata* sowie *Trichosporon cutaneum* und *fermentans*, mit Einschränkungen auch *Rhodotorula mucilaginosa*. Bei allen übrigen untersuchten Arten und Stämmen ist damit zu rechnen, daß sie bei der oft empfohlenen Routinekonzentration von 500 µg/ml (0,05 %) soweit im Wachstum unterdrückt werden, daß sie nicht mehr diagnostiziert werden können. So folgten mit steigender Empfindlichkeit die übrigen untersuchten *Torulopsis*-Arten, *Trichosporon capitatum* und *pullulans* sowie *Candida species* (ohne *Candida albicans*), wo bereits bei 100 µg/ml (0,01 %) der Großteil der untersuchten Stämme

total im Wachstum gehemmt wurde. Sehr empfindlich reagierte auch *Rhodotorula species* auf Acti-dione. Für 27 Stämme war 100 µg/ml (0,01 %) die maximale nicht total hemmende Konzentration. 5 Stämme von *Rhodotorula rubra* und *pallida* wurden hier bereits total, die übrigen Stämme und Arten stark partiell gehemmt. Die empfindlichste Hefe war *Cryptococcus neoformans*, da bereits bei 10 µg/ml (0,001 %) 2 von 6 Stämmen total im Wachstum gehemmt wurden und die übrigen zwar nur partiell aber deutlich. Die Hefestärkebildung dieser Art wurde durch Acti-dione nicht unterdrückt. Allgemein wurde mit steigender Konzentration des Acti-dione die Oberfläche der Hefen cremiger und flächenhafter und die Farbe der Kolonien gelblicher. Die auffallendsten makroskopischen Veränderungen waren bei *Trichosporon species* zu beobachten.

Da Kaliumtellurit und Acti-dione offensichtlich eine wachstumshemmende und zellschädigende Wirkung auch auf Hefezellen haben, war die Frage zu überprüfen, in wie weit diese Schädigung bei Weiterzüchtung auf hemmstofffreien Nährboden reversibel ist. Diese Frage hat besondere Bedeutung für die morphologischen Untersuchungen auf Reisagar. Es wäre denkbar, daß auf kaliumtellurit- oder acti-dione-haltigem Nährboden angezüchtete Hefen bei der Untersuchung auf Reisagar infolge der Vorschädigung nicht mehr die morphologischen Merkmale ausbilden, die zu ihrer genauen Identifizierung erkannt werden müssen (Chlamydosporen für die Diagnose *Candida albicans*, Pseudomycel für die Diagnose der Gattung *Candida*, Arthrosporen für die Diagnose der Gattung *Trichosporon*).

Bei makroskopischer Beurteilung des Wachstums bei Weiterzüchtung auf hemmstofffreiem Kimmig-Agar nach Abimpfung von kaliumtellurit-haltigem Medium zeigte nur *Candida albicans* eine deutliche Wachstumserholung ; nach Abimpfung von acti-dionehaltigem Kimmig-Agar kam es bei allen geprüften Hefen zu einer deutlichen Regeneration.

Bei der mikroskopischen Untersuchung auf hemmstofffreiem Reisagar nach Abimpfung von höher konzentriertem Kalium-Tellurit-Medium zeigten sich Verformungen und zunehmende Degeneration der Blastosporen, wobei die dunkelschwarzen, granulierten Einlagerungen des reduzierten Tellurits bei den *Candida*-Zellen einheitlicher verteilt waren als bei den *Trichosporon*-Zellen. Dieses intrazelluläre Tellurit wurde auch zum Teil an die Tochterzellen weitergegeben. Während bei *Candida albicans* eine Abnahme der Pseudomycel- und Chlamydosporenbildung zu beobachten war, zeigten nur 12 der 38 übrigen *Candida*-Stämme eine Verminderung des Pseudomyceles. Nur bei 4 Stämmen war diese Hemmung nach Wachstum auf der Routinekonzentration von 300 µg/ml (0,03 %) so stark, daß eine Identifizierung nicht mehr möglich wäre. 23 *Candida*-Stämme zeigten überraschenderweise eine Vermehrung der Pseudomycelbildung, der Rest blieb unverändert. *Trichosporon species* wies eine Verminderung des Myceles und der Arthrosporen nach Einwirkung von Kaliumtellurit auf. Die mikroskopischen Veränderungen waren bei *Trichosporon* weniger ausgeprägt als bei *Candida*, was auch für die Acti-dione-Untersuchungen gilt.

Nach Wachstum auf den acti-dione-haltigen Nährböden fand sich mikroskopisch auf Reisagar ohne Zusatz mit

steigender Konzentration ebenfalls eine zunehmende Polymorphie und pathologische Degeneration von Blastosporen. Diese Veränderungen waren bei *Candida* stärker als bei *Trichosporon*. Im Gegensatz zur makroskopischen Resistenz gegenüber Acti-dione zeigte diese Art mikroskopisch eine deutliche Verringerung der Pseudomycelbildung und des Chlamydosporenwachstums. Von den übrigen *Candida*-Arten zeigten dagegen nur 4 Stämme eine Verminderung des Pseudomycels, 9 Stämme blieben unverändert. Bei 25 Stämmen kam es unabhängig von der Art zu einer unerwarteten Zunahme des Pseudomycels. *Trichosporon species* ließ eine Abnahme der Mycel- und Arthrosporenbildung erkennen, wobei die Veränderungen der typischen Wuchsformen bei *Trichosporon cutaneum* deutlicher als bei *Trichosporon capitatum* waren. Nach Abimpfung von acti-dione-haltigen Nährböden auf Reisagar ist keine totale Inhibition in der Ausbildung der taxonomisch wichtigen Merkmale zu erwarten.

Die Wirkung von Kaliumtellurit und Acti-dione auf das Wachstum der Hefekulturen war von der angewendeten Konzentration einerseits, von der Empfindlichkeit der jeweiligen Art bzw. des jeweiligen Stammes andererseits abhängig. Im allgemeinen nahmen die beschriebenen Veränderungen makroskopischer wie mikroskopischer Art mit steigender Hemmstoffkonzentration im Nährboden an Deutlichkeit zu und waren bei der jeweiligen maximalen nicht total hemmenden Konzentration am stärksten. Bei der über 14 Tage gehenden makroskopischen Auswertung blieben die beschriebenen Veränderungen unverändert bestehen, bei einem Teil der Hefen kam es anfänglich noch zu einer zwei- bis dreitägigen Wachstumsverzögerung. Mikroskopisch blieben die Veränderungen durch Kaliumtellurit

auch auf der hemmstofffreien Reisagarplatte während des 14-tägigen Zeitraumes weitgehend erhalten, während es nach Abimpfung von den acti-dione-haltigen Nährböden besonders bei Trichosporon zu einer zunehmenden Angleichung an die Kontrollkulturen kam. Einzelne Stämme von den genannten imperfekten Hefen zeigten jedoch ein von diesen Regeln abweichendes Verhalten.

Trotz dieser besonders bei Acti-dione einschränkenden Befunde erscheint es nicht ratsam, die in der modernen mykologischen Labordiagnostik empfohlenen Konzentrationen der Hemmstoffe in Routinenährböden zu senken, da dann auch ihr erwünschter Effekt in Frage gestellt wird. Besser ist es, zwei Parallelkulturen, von denen die eine Acti-dione, die andere Kaliumtellurit als Nährbodenzusatz enthält, zu beimpfen, da dann nach unseren Ergebnissen alle pathogenen Sproßpilze aus dem täglich anfallenden Untersuchungsmaterial isoliert und erkannt werden können.

Die Reduktion von Kaliumtellurit und die dadurch bedingte Ausbildung von schwarzen Farbstoffen kam bei allen Hefegattungen vor und ist daher nicht zur Unterscheidung bestimmter Gattungen oder gar Arten geeignet. Auch die weiter beobachteten Pigmentanordnungen wie verschieden starke Tellurablagerungen und der helle Randsaum traten bei der Routinekonzentration von Kaliumtellurit nicht so konstant auf, daß sie zu diagnostischen Zwecken herangezogen werden könnten. Gerade bei dieser Konzentration übertönte das Tellurpigment die Eigenfarbstoffbildung bei Rhodotorula, so daß hier sogar eine gewisse Einschränkung in der Gattungsdiagnostik gegeben ist.

Auch Acti-dione ruft weder makroskopische noch mikrosko-

pische Wirkungen an den imperfekten Hefen hervor, die als taxonomische Merkmale zu einer schnelleren Differenzierung und Identifizierung der Sproßpilze beitragen können.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ADAM,W. u. K.STEITZ :

Zur Wirkung von Cycloheximid auf Pilzkulturen.
Z.Haut-u.Geschl.-Kr. 25, 153 - 161 (1958)

2. ADAM,W. u. L.SCHWANKL :

Zur Resistenz von Schimmelpilzen gegen Cycloheximid. In : Krankheiten durch Schimmelpilze bei Mensch und Tier. Hrsg. von H.GRIMMER u. H.RIETH.
Springer : Berlin - Heidelberg - New York, 1965

3. AMDUR,M.L. :

Tellurium. Accidental exposures and treatment with BAL in oil.
Occupat.Med.3, 386 - 389 (1947)

4. ASCHNER,M., J.MAGER and J.LEIBOWITZ :

Production of extracellular starch in cultures of capsulated yeasts.
Nature (London) 156, 295 - 300 (1945)

5. BARNETT,H.L. :

Illustrated genera of imperfect fungi.
Burgess Publishing Co. : Minnesota, 1960

6. BEECH,F.W. and J.G.CARR :

A survey of inhibitory compounds for the separation of yeasts and bacterid in apple juices and ciders.
J.gen.Microbiol.12, 85 - 94 (1955)

7. BENEKE,E. :

The medical mycology.
Burgess Publishing Co : Minnesota 1957

8. BEYER,I.L. :

Durch welchen Bestandteil der lebenden Zelle wird die Tellursäure reduziert ?
Arch.Physiol. Du Bois-Reymond 1895.
(Zit.nach GOSIO)

9. BROWNING, E. :
Toxicity of industrial metals.
Butterworths : London 1961
10. BUHLMANN, X. :
Beitrag zur Prüfung der Assimilationsfähigkeit
von Hefen. In : Hefepilze als Krankheitser-
reger bei Mensch und Tier.
Hrsg. von C.SCHIRREN und H.RIETH.
Springer : Berlin - Göttingen - Heidelberg, 1963
11. CERWENKA, E.A. and C.H.COOPER :
Toxicology of selenium und tellurium and their
compounds.
Arch.environment.Health 3, 189 - 194 (1961)
12. CH'IN, T.L. :
Potassium tellurite and coppersulfate in
Sabouraud's medium for isolation of patho-
genic fungi.
Proc.Soc.Exper.Biol.Med.38, 700 - 702 (1938)
13. CONRADI, H. u.P.TROCH :
Ein Verfahren zum Nachweis von Diphtherie-
bazillen.
Zbl.Bakt.Ref.54, 63 - 66 (1912)
14. CORMANE, R.H. and W.R.O.GOSLINGS :
Factors influencing the growth of Candida albi-
cans (in vitro and in vivo studies)
Sabouraudia (Edinburgh) 3, 52 - 63 (1963)
15. COUDERT, J. :
Guide pratique de mycologie medicale.
Masson et Cie. : Paris 1955
16. DASTIDAR, S.G. :
Growth requirements of Candida species.
Indian J.Exp.Biology 5, 228 - 232 (1967)
17. DAVIS, J.C. and S.MUDD :
Reducing sites in bacterial cells of the anaerobic
genus Clostridium and their differentiation from
other cell structures.
J.Histochem.Cytochem.5, 254 - 263 (1957)

18. DIDDENS, A.H. u. J. LODDER :
Beiträge zu einer Monographie der Hefearten :
III. Teil : Die anaskosporogenen Hefen, 2.
Hälfte.
North Holland Publ.Co. : Amsterdam 1942
19. DUNCAN, J.T. :
Mycology in relation to dermatology.
In : Modern trends in dermatology.
Hrsg. Mac KENNAN. Butterworths : London 1948
20. ELORZA, M.V. :
Effect of cycloheximide on yeast cellwall
synthesis.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 36, 741 - 747 (1969)
21. FARROCHZAD, S. :
Vergleichende mykologische Untersuchungen mit
verschiedenen Nährböden unter besonderer Be-
rücksichtigung des Cycloheximid-Antibiotica-
Agars. Inaug.-Diss. Gießen 1959
Ref. Derm. Wschr. 148, 553 (1963)
22. FEGELER, F. :
Cycloheximid-Agar, ein Fortschritt in der
Züchtung von Dermatophyten.
Dermatologica 113, 63 - 70 (1956)
23. FISCHER, E. :
Die Technik der Identifizierung hefeartiger
Organismen.
Schweiz. Z. allg. Path. 16, 86 - 96 (1953)
24. FOERST, W. :
Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie.
Hrsg. von W. FOERST. 3. Auflage, Bd. III, S. 736
Urban und Schwarzenberg : München - Berlin 1953
25. FORD, H.H. and B.E. LEACH :
Acti-dione, an antibiotic from Streptomyces
griseus.
J. amer. chem. Soc. 70, 1223 - 1225 (1948)
26. FOURNIER, L. et O. LAVADITI :
Essays de tellurothérapie dans le Syphilis
humaine.
C.R. Séances Soc. Biol. 95, 86 - 91 (1926)

27. FRANKE, K.W. and A.L. MOXON :
Toxicity of orally ingested arsenic, selenium,
tellurium, vanadium and molybdenum.
J.pharmacol. 61, 89 - 102 (1937)
28. FRIEDRICH, E. :
Beiträge zur Hygiene und Epidemiologie.
Heft 16 : Die Sproßpilze des Menschen.
Joh. Ambros. Barth Verlag : Leipzig 1962
29. FUENTES, C.A., G. TRESPALACIONES, F. BAQUERE and R. ABOULAFIA :
Effect of acti-dione on mold contaminants and
on human pathogens.
Mycologia (New York) 44, 170 - 175 (1952)
30. FUJJINO, T. :
Studies on the fine structure of Candida-
albicans-cells with special reference to
the nuclear site.
Biken J. 8, 1 - 15 (1965)
31. GEMEINHARDT, H. :
Zur Frage der selektiven Anzüchtung von
Dermatophyten durch Desertomycin.
Derm. Wschr. 151, 756 - 761 (1965)
32. GEORG, L.K., L. AJELLO and M.A. GORDON :
A selective medium for the isolation of
Coccidioides immitis.
Science 114, 387 - 389 (1951)
33. GEORG, L.K. :
Use of cycloheximide medium for isolation
of dermatophytes from clinical materials.
Arch. Derm. Syph. (Chicago) 67, 355 - 361 (1953)
34. GIAMBANCO, V. et R. BAUSINI :
Meccanismo della riduzione del tellurite in
culture et in cellule non proliferanti di
Candida lipolytica.
Riv. Ist. Sieroter Ital. 41, 341 - 351 (1966)

35. GMELIN :

Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie.
Hrsg.von der deutschen chemischen Gesellschaft
(Hauptredakteur E.PIETSCH). 8. Auflage, System
Nr. 22, S. 799 - 804
Verlag Chemie GmbH : Berlin 1938

36. GOSIO,B. :

Indikatoren des Bakterienlebens und ihre
praktische Bedeutung.
Z.Hyg.51, 65 - 125 (1905)

37. GORDON,M.A. and G.N.LITTLE :

Effective dehydrated media with surfactants
for identification of Candida albicans.
Sabouraudia (Edinburgh) 2, 171 - 175 (1963)

38. GÖTZ,H. :

Gegenwärtige Probleme und Ergebnisse der
Dermatomykosenforschung.
Z.Haut.-u.Geschl.-Kr.8, 3 - 15 (1950)

39. GÖTZ,H. u. E.M.HERTLEIN :

Förderung der Züchtung von Dermatophyten
durch Cycloheximid-Kaliumtellurit-Selektiv-
nährböden und Soforteinsatz des Untersuchungs-
materials.
Derm.Wschr.139, 8 - 13 (1959)

40. GÖTZ,H. :

Die Pilzkrankheiten der Haut durch Dermato-
phyten. In : Jadassohn's Handbuch der Haut-
u.Geschl.Kr., Ergänzungswerk IV/3.Springer :
Berlin - Göttingen - Heidelberg 1962

41. GÖTZ,H., H.C.STURDE u. D.HANTSCHKE :

Die Häufigkeit der Pilzinfektion bei Berg-
leuten.
Hautarzt 16, 62 - 66 (1965)

42. GRAY,Ph.P. :

Some advances in microbiological control
for beer quality.
Wallerstein Lab.Comm.14, 169 - 184 (1951)

43. GREEN, S.R. and Ph.P. GRAY :
A differential procedure applicable to
bacteriological investigation in brewing.
Wallerstein Lab. Comm. 13, 357 - 368 (1950)
44. GREEN, S.R. and Ph.P. GRAY :
A differential procedure for bacteriological studies useful in the fermentation industry.
Wallerstein Lab. Comm. 14, 289 - 195 (1951)
45. HANSEN, H. :
Versuche über die Wirkung von Kaliumtellurit auf den lebenden Organismus.
Liebigs Ann. chem. pharm. 86, 208 (1835)
(Zit. nach GOSIO)
46. HAUFÉ, F. :
Zur Verwendung von Kaliumtellurit als Nährbodenzusatz bei der Züchtung von Dermatophyten.
Derm. Wschr. 141, 171 - 174 (1960)
47. HAUFÉ, F. :
Zur Verwendbarkeit von Cycloheximid als Nährbodenzusatz.
Mykosen 4, 126 - 127 (1961)
48. HAUFÉ, F. :
Die Wirkung von Cycloheximid auf die experimentelle Cephalosporiose im Tierversuch.
Derm. Wschr. 147, 631 - 635 (1963)
49. HAYES, A.B. :
Chlamydo-sporenproduktion in *Candida albicans*.
Mycopathologia (den Haag) 29, 187 - 196 (1966)
50. JANKE, A. :
Sporobolomyces roseus var. *madurae* var. nov.
und die Beziehung zwischen den Genera *Sporobolomyces* und *Rhodotorula*.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 161, 514 - 520 (1954)

51. JUNG, H.D. u. H.GERHARDT :
Darstellung der Redoxfermente bei Dermato-
phyten und Saprophyten durch Kaliumtellurit.
Derm.Wschr.147, 663 - 668 (1963)
52. KACHNIC, M. :
Value of media containing acti-dione for
the cultivation of dermatophytes.
Csl.Derm.(Praha) 37, 40 - 44 (1962)
53. KACHNIC, M. u. P.KOVAC :
Sechsjährige Erfahrung mit Cycloheximid
(Acti-dione) in der humanen mykologischen
Diagnostik.
Mykosen 8, 168 - 176 (1965)
54. KÄRCHER, K.H. :
Die Candidamykose. In : J.Jadassohn : Handb.
d.Haut-u.Geschl.Kr., Ergänzungswerk IV/4.
Springer : Berlin - Göttingen - Heidelberg -
1963
55. KÄRCHER, K.H. :
Durch verschiedene Hefen bedingte Dermatosen.
In : J.Jadassohn : Handb.d.Haut-u.Geschl.Kr.,
Ergänzungswerk IV/4.
Springer : Berlin - Göttingen - Heidelberg.
1963
56. KAFFKA, A. :
Tellurithaltige Serumnährmedien zur Diffe-
renzierung von Candida albicans.
Zbl.Bakt.I.Abt.Orig.165, 264 - 274 (1956)
57. KALKOFF, K. u. D.JANKE :
Mykosen der Haut. In : Dermatologie und
Venerologie II/2 von Gottron und Schönfeld.
Thieme : Stuttgart 1958
58. KAMINSKY, D. and L.QUINLAN jr. :
A simple inexpensive method for rapid identi-
fication of Candida albicans.
Amer.J.clin.Path.40, 143 - 145 (1963)

59. KEALL, J.H.H., N.H.MARTIN and R.E.TUNBRIDGE :
A report of three cases of accidental poisoning by sodium tellurite.
Brit.J.ind.Med.3, 175 - 176 (1946)
60. KIELHÖFER, E. u. H.AUMANN :
Untersuchungen über die Wirkung des Antibiotikums Acti-dione auf Hefen im Vergleich mit anderen fungitoxischen Substanzen.
Z.Lebensmitteluntersuchung 105, 283 - 288 (1957)
61. KIELSTEIN, P. :
Zur Verwendung verschiedener Pilzhemmungsmittel für die selektive kulturelle Isolierung von Trichophyton-Arten.
M-hefte Vet.med.18, H.3 (1963)
62. KIMMIG, H. u. H.RIETH :
Antimykotica in Experiment und Klinik.
Arzneimittelforschung 3, 267 - 276 (1953)
63. KNOTH-BORN, R.C., W.KNOTH u. S.FARROCHZAD :
Vergleichende mykologische Untersuchungen mit verschiedenen Nährböden.
Z.Haut-u.Geschl.Kr.29, 85 - 90 (1960)
64. KORNFELD, E.C., R.G.JONES and Th.V.PARKE :
The structure and chemistry of acti-dione, an antibiotic from Streptomyces griseus.
J.amer.chem.Soc.71, 150 - 159 (1949)
65. KUTSCHER, A.H. :
Growth characteristics of Candida albicans on Pagano-Levin-culture medium.
J.invest.Derm.33, 41 - 47 (1959)
66. LEACH, B.E., J.H.FORD and A.J.WHIFFEN :
Acti-dione, an antibiotic from Streptomyces griseus.
J.amer.chem.Soc.69, 474 (1947)
67. LENKER, V. and E.WOLESENSKY :
J.amer.chem.Soc.35, 720 (1913)
(Zit.nach GMELIN)

68. LEWIN, A.J., W. KLOMPARENS and V.D. MOSS :
Translocation and persistence of cycloheximide
in white pines.
Forest.Sc.6, 306 - 309 (1960)
69. LITTMANN, M.L. :
Growth of pathogenic fungi on a new culture
medium
Amer.J.clin.Path.18, 409 - 420 (1948)
70. LODDER, J. :
Beiträge zu einer Monographie der Hefearten :
II. Teil : Die anaskosporogenen Hefen, 1.
Hälfte. North Holland Publ.Co. :
Amsterdam 1934
71. LODDER, J. and A. de MINJER :
On the biology of the pathogenic *Torulopsi-*
doideae. In : Biology of pathogenic fungi.
Edited by W.J. NICKERSON, Ph.D.
Annales Cryptomici et Phytopathologici, 7 - 19
(1947)
72. LODDER, J. and N.J. KREGER VAN RIJ :
The Yeasts. A taxonomic study.
North Holland Publ.Co. : Amsterdam 1952
73. LOEWENTHAL, K. :
Appraisal of Sabouraud's-, cycloheximide-,
and oxgall-agars.
Arch.Derm.(Chicago) 84, 256 - 260 (1961)
74. MACKENZIE, P.W.R. :
Morphogenesis of *Candida albicans* in vivo.
Sabouraudia (Edinburgh) 3, 225 - 232 (1964)
75. MAGER, J. and M. ASCHNER :
Biological studies on capsulated yeasts.
J.Bact.53, 282 - 295 (1947)
76. MAHLER, H.R., Ph. PERLMAN, C. HENSON and C. WEBER :
Selective effects of chloramphenicol, cyclo-
heximide and nalidixic acid on the biosynthe-
sis of respiratory enzymes in yeasts.
Biochem.Biophys.Res.Comm.31, 474 - 480 (1968)

77. MALE, O. :

Zur Identifizierung der Hefen im mykologischen Labor. In : Hefepilze bei Mensch und Tier.
Hrsg. von C.SCHIRREN und H.RIETH
Springer : Berlin - Göttingen - Heidelberg, 1963

78. MEINHOF, W. u. H.RIETH :

Differentialdiagnostische Bewertung des Nachweises von Pilzfäden in Haarfollikeln und Nägeln bei generalisierter Candidamykose.
Hautarzt 13, 111 - 117 (1962)

79. DE MEIO, R.H. :

Tellurium II. : Effects of ascorbic acid on the breath.
J.ind.Hyg.Toxicol.29, 393 - 397 (1947)

80. DE MEIO, R.H. and W.W.ZETTER :

Tellurium III. : The toxicity of ingested tellurium dioxide for rats.
J.ind.Hyg.Toxicol.30, 53 - 59 (1948)

81. MORTON, H.E. and T.F.ANDERSON :

Electronmicroscopic studies of biological reactions; reduction of potassium tellurite by *Corynebacterium diphtheriae*.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med.46, 272 - 276 (1941)

82. MÜLLER, H.L., K.KOEPPE u. W.SCHIFF :

Die Chlamydosporenbildung und ihre Verwendung zur Schnelldiagnostik der Sproßpilze.
Zbl.Bakt.I. Abt.Orig.203, 403 - 415 (1967)

83. NERMUT, M.V. :

L-cyklus bakterič a jeho biologický význam.
Med.-Dissert., Brno (1957)

84. NERMUT, M.V. :

Über die Reduktion von Kalium tellurosum durch die Bakterienzelle.
Zbl.Bakt.I. Abt.Orig.178, 336 - 348 (1960)

85. NEWTON, A., E.D. SHAW, C.S. GOODE and F.O. RIGGALL :
Identification of *Candida albicans*.
Further work on the rapid identification of
Candida albicans.
J. invest. Derm. 35, 123 (1960)
86. NICKERSON, W.J. and N.J.W. KREGER VAN RIJ :
Biochem. Biophys. Acta 3, 461 (1949)
(Zit. nach WINDISCH)
87. NICKERSON, W.J., W.A. TABER and G. FALCONE :
Physiological bases of morphogenesis in fungi.
5. Effect of selenite and tellurite on cellular
division of yeast like fungi.
Canad. J. Microbiol. 2, 575 - 584 (1956)
88. NICKERSON, W.J. :
Reduction of inorganic substances by yeasts;
extracellular reduction of sulfite by species
of *Candida*.
J. infect. Dis. 93, 43 - 56 (1953)
89. NORDBRING-HERTZ, B. :
Studies on growth and inhibition of *Candida*
albicans.
Physiol. Plant. 8, 691 - 717 (1955)
90. PAGANO, J., J. LEVIN and W. TREJO :
Diagnostic medium for differentiation of *Candida*
In : Antibiotics annual; P. 137 - 143.
Medical Encyclopedia Inc. : New York 1957 - 58
91. PEYNAUD, M.E. et M.S. LAFOURCADE :
Etude d' antibiotiques et d' antiseptiques
nouveaux actifs sur le genre *Saccharomyces*.
Compt. rend. Acad. Sci. France 236, 1924 - 1925
(1953)
Ref. : Fermentat Ind. aliment. 8, 228 (1953)
92. PHILLIPS, G.B. and E.J. HANEL jr. :
Control of mold contaminants on solid media
by the use of acti-dione.
J. Bact. 60, 104 - 105 (1950)

93. POLEMANN, G. :
Klinik und Therapie der Pilzkrankheiten.
Georg Thieme : Stuttgart 1961
94. REISERT, W. :
The so-called bismuth breath.
Amer.J.Pharm.56, 177 (1884)
(Zit.nach FOERST)
95. RIETH, H. :
Differentialdiagnose der Candidapilze.
Arch.klin.exp.Derm.205, 541 - 550 (1958)
96. RIETH, H. :
Untersuchungen zur Hefediagnostik in der
Dermatologie.
Arch.klin.exp.Derm. 207, 413 - 430 (1958)
97. RIETH, H., K.ITO u. C.SCHIRREN :
Japanreis in der Hefediagnostik.
Hautarzt 9, 36 - 38 (1958)
98. RIETH, H., P.HANSEN, A.E.EL FIKI u. K.ITO :
Hefedifferenzierung auf Reisagar.
Bull.Pharm.Res.Inst.(Osaka) 19, 13 - 18
(1959)
99. RIETH, H. u. J.SCHÖNFELD :
Zur Diagnostik und Therapie der Mykosen
durch imperfekte Hefen (Cryptococcaceae).
Arch.klin.exp.Derm.208, 343 - 361 (1959)
100. RIETH, H. :
Die Mykosen. Entstehung, Erkennung und Be-
handlung von Pilzkrankheiten.
Folia Ichthyologica, Heft 6 (1964)
u. mykologische Ergänzung zu Heft 6.
101. ROSENTHAL, S.A. and D.FURNARI :
Pagano-Levin-medium for the isolation and
identification of Candida albicans.
J.invest.Derm.34, 229 - 230 (1960)

102. SABOURAUD, R. :

Les Teignes.
Masson & Cie. : Paris 1910

103. SCHABINSKY, G. :

Grundriß der medizinischen Mykologie.
Fischer : Jena 1960

104. SCHMIEDT, E.G. :

A microbiological study of *Cryptococcus neoformans*.
Arch.Biochem.26, 12 - 24 (1950)

105. SCHÖNBORN, C. :

Über Erfahrungen mit Kaliumtellurit in der mykologischen Laboratoriumspraxis.
Zbl.Bakt.I.Abt.Orig.201, 406 - 411 (1966)

106. SCHÖNBORN, C. :

Hinweise zur Differenzierung medizinisch bedeutsamer Sproßpilze.
Med.Bild.10, 72 - 77 (1967)

107. SCHARVILL, J. and J.M.TALBOT .

Cycloheximide in the isolation of dermatophytes
Brit.J.Derm.66, 241 - 217 (1954)

108. SHIE, M.P. and F.E.DEEDS :

The importance of Tellurium as a health hazard in industry.
U.S.Publ.Health Rep.35, 939 (1920)

109. SHOU-TAU LIU :

Studies on properties of *Candida* and its classification :
Oto-Rhino-Laryng.-Clin.(Kyoto) 52,
Suppl.engl.Zus.fass.(Japanisch) (1959)

110. SIEGEL, M.R., H.D.SISLER and F.JOHNSON

Relationship of structure to fungitoxicity of cycloheximide and related glutaramide derivatives.
Biochem.Pharmacol.15, 1213 - 1223 (1966)

111. SINSKI, J.T. :

The effectiveness of Pagano-Levin medium for detection and identification of *Candida albicans* in clinical specimens.
*J.invest.Derm.*35, 131 - 133 (1960)

112. SOSKOVA, L., A.SVOBODA et J.SOSKA :

The effect of acti-dione on the regeneration of yeast protoplasts.
*Folia microbiol.(Praha)*13, 240 - 244 (1968)

113. STAIB, F. :

Ein Beitrag zur Morphologie von *Trichosporon cutaneum* bei Verwendung von Kaliumtellurit.
*Zbl.Bakt.II.Abt.*112, 38 - 42 (1959)

114. STEINBERG, H.H., S.C.MASSARI, A.C.MINER and R.RINK :

Industrial exposure to tellurium :
Atmosphaeric studies and clinical evaluation.
*J.ind.Hyg.Toxicol.*24, 183 - 192 (1942)

115. STELLING-DECKER :

Beiträge zu einer Monographie der Hefearten :
I. Teil : Die sporogenen Hefen.
North Holland Publ.Co. : Amsterdam 1931

116. STRANDSKOV, F.B. and J.B. BOCKELMANN :

New method for counting the bacterial contaminants of brewers yeast.
*J.Inst.Brew.*57, 123 - 124 (1951)

117. SWOBODOVA, Y. and L.CHMEL :

A method for the rapid identification of pathogenic yeast-like microorganisms.
Mycopathologia (den Haag) 26, 403 - 409 (1965)

118. TASCHDJIAN, C. :

A simply prepared identification medium for *Candida albicans*.
Mykologia (New York) 45, 474 (1953)

119. THURNER, J. :

Veränderungen der Schimmelpilze durch Acti-dione.
Hautarzt 15, 599 - 601 (1964)

120. TURNER, R.A. :
Screening methods in pharmacology.
Academic Press : New York, 1965
121. TRABER, J. :
Effects of cycloheximide in ribosomal RNS-synthesis in yeasts.
Biochem.Biophys.Res.Comm.34, 488 - 494 (1969)
122. UPJOHN COMPANY :
Beschreibung von Acti-dione^R in der Originalpackung (1961)
123. URI, J. u. Z.HERPAY :
Die Anwendung des Desertomycins für die selektive kulturelle Isolierung von menschenpathogenen Pilzen.
Mykosen 4, 128 (1961)
124. VANBREUSEGHEM, R. et M.VAN BRUSSEL :
Emploi et signification des cultures de dermatophytes sur terre et milieu à base de terre.
Ann.Parasit.hum.comp.27, 541 - 546 (1952)
125. VANĚK, U., M. PŮŽA, J. CUDLÍN, M. VONDŘÁČEK et R.W. RICKARDS :
Metabolites of Streptomyces noursei.
X. Biogenesis of cycloheximide.
Folia microbiol. (Praha) 14, 388 - 397 (1969)
126. VERONA, O. et G. PICCI :
Interno all' azione inibitrice dell' acti-dione sui lieviti della fermentazione vinava. Atti d. Accad. Naz. de Lincei Rendicanti Cl. d. Science fisiche VIII. 14., 15., 680 - 687 (1953)
127. WARZECHA, A. :
Der Einfluß der Sorbinsäure, Propionsäure und des Acti-dione auf die Entwicklung des Trichophyton gypseum var. asteroides.
Mycopathologia (den Haag) 20, 287 - 296 (1964)
128. WELD, J.T. :
"Candida albicans". Rapid identification in cultures made directly from human material.
Arch.Derm.Syph. (Chicago) 67, 473 - 478 (1953)

129. WHIFFEN, A.J., N. BOHONOS and R.L. EMERSON :
The production of an antifungal antibiotic
by *Streptomyces griseus*.
J. Bact. 52, 610 - 611 (1946)
130. WHIFFEN, A.J., N. BOHONOS, R.L. EMERSON and UPJOHN COMPANY :
Amerkanisches Patent (AP) 2574519 (1946)
131. WHIFFEN, A.J. :
The production, assay and antibiotic activity
of acti-dione, an antibiotic from *Streptomyces*
griseus.
J. Bact. 56, 283 - 291 (1948)
132. WHIFFEN, A.J. :
The activity in vitro of cycloheximide (acti-
dione) against fungi pathogenic to plants.
Mycologia (New York) 42, 253 - 257 (1950)
133. WICKERHAM, L.J. :
Taxonomy of yeasts.
Technical Bulletin Nr. 1029, Dept. of Agri-
culture Washington D.C. (1951)
134. WINDISCH, S. :
Teil A. Biologie der hefeartigen Pilze. In :
Die Hefen. Hrsg. von Reiff, Kontzmann, Luers,
Lindemann. Bd. I : Die Hefen in der Wissenschaft
Verlag Hans Carl : Nürnberg 1960
135. WINNER, H.J. and R. HURLEY :
Candida albicans.
J. & A. Churchill Ltd. : London 1964
136. YAMAMURA, Y. et T. KAMAKORA :
J. Japan. Biochem. Soc. 28, 135 (1956)
(Zit. nach JUNG und GERHARDT)
137. ZANGGER, J. :
Über die Verwendung von Acti-dione in der medi-
zinisch-bakteriologischen Diagnostik.
Schweiz. Z. Path. Bakt. 22, 536 - 539 (1959)

Besonderer Dank sei Herrn Prof.Dr.W.Meinhof ausgesprochen für die freundliche Überlassung des Themas sowie für seine hilfreiche Unterstützung und große Geduld bei der Fertigstellung der Arbeit.

Auch Herrn Prof.Dr.O.Braun-Falco möchte ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes herzlich danken.

L e b e n s l a u f

Ich, Rainer Alfred Kolz, wurde am 17. März 1943 als Sohn des Tierarztes Alfred Kolz und der Lehrerin Wilhelmine Kolz, geb. Pitschan, in Waldenburg geboren.

Nach Absolvierung des Abiturs 1962 leistete ich für zwei Jahre meine Pflichtwehrdienstzeit ab.

Im Wintersemester 1964/65 begann ich das Studium der Medizin an der Universität München, wo ich im Wintersemester 1971/72 mit sehr gutem Erfolg mein Staatsexamen ablegte.

Nach einem Jahr Medizinalassistentenzeit (Chirurgie, Innere Medizin, Gynäkologie) arbeitete ich zunächst 17 Monate als Arzt auf einer chirurgisch-anaesthesiologischen und anschließend internen Abteilung.

Seit dem 1. Oktober 1974 bin ich Assistenzarzt an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München.

